

**Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte**

**Normunds Jurka**

**Smēķēšanas ietekme uz hroniska iekaisuma  
būtiskām pazīmēm ierosinātajās krēpās un  
asinīs slimniekiem ar obstruktīvām plaušu  
patoloģijām**

**Darba zinātniskais vadītājs:**

**Dr. hab. med., profesors**

**Immanuels Taivans**

**Rīga, 2006**

**Darbs veikts ar Eiropas Sociālā Fonda atbalstu**



**Promocijas darbs veikts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē  
un Paula Stradiņa klīniskajā universitātes slimnīcā**

**Oficiālie recenzenti:**

**asociētais profesors, Dr. med. Jānis Sīpols,  
docents, Dr. med. Alvils Krams,  
profesors, Dr. hab. med. Vasīlijs Trofimovs.**

**Habilitācijas un promocijas padomes priekšsēdētāja:**

**profesore, Dr. hab. med. Renāte Ligere**

**Aizstāvēšana notiks 2006. gada 3. maijā pulksten 12<sup>00</sup> Latvijas  
Universitātes medicīnas, bioloģijas un farmācijas nozaru promocijas  
padomes sēdē Rīgā, Raiņa bulvārī 19 LU Mazajā aulā.**

## Saturs

Saturs.....	3
Saīsinājumi.....	7
Statistikas saīsinājumi.....	11
Kopsavilkums .....	13
Summary.....	17
Kopsavilkums krieviski .....	21
Ievads .....	26
Literatūras apskats .....	30
1. Obstruktīvās plaušu iekaisumslimības.....	30
1.1. Bronhiālā astma: iekaisumšūnas, to aktivācijas un mijiedarbības mehānismi .....	36
1.1.1. Akūts alerģisks iekaisums.....	36
1.1.1.1. Agrīnās fāzes reakcija.....	36
1.1.1.1.1. Tuklo šūnu un bazofilo leikocītu izdalītie iekaisuma mediatori .....	36
1.1.1.1.1.1. Primārie mediatori .....	37
1.1.1.1.1.2. Sekundārie mediatori .....	37
1.1.1.1.2. Vēlīnās fāzes reakcija .....	39
1.1.2. Hronisks alerģisks iekaisums.....	40
1.1.2.1. Bronhu epitēlijšūnas.....	40
1.1.2.2. Eozinofīlie leikocīti.....	42
1.1.2.3. Limfocīti .....	45
1.1.2.4. Tuklās šūnas un bazofīlie leikocīti.....	45
1.1.2.5. Neitrofilie leikocīti.....	46
1.1.2.6. Makrofāgi.....	48
1.1.2.7. Fibroblasti .....	51
1.1.2.8. Trombocīti.....	52
1.2. Hroniska obstruktīva plaušu slimība (HOPS): iekaisumšūnas un to aktivācijas un mijiedarbības mehānismi .....	54
1.2.1. Bronhu epitēlijšūnas.....	54
1.2.2. Neitrofilie leikocīti.....	57
1.2.3. Makrofāgi.....	60
1.2.4. Eozinofīlie leikocīti.....	63
1.2.5. Limfocīti .....	65
1.2.6. Tuklās šūnas un bazofīlie leikocīti.....	66
1.2.7. Fibroblasti .....	66
1.3. Oksidatīvais stress.....	66
1.3.1. Oksidanti un to veidošanās .....	67
1.3.1.1. Superoksīds .....	67
1.3.1.2. Hidroperoksilradikālis.....	68
1.3.1.3. Ūdeņraža peroksīds .....	68
1.3.1.4. Hidroksilradikālis.....	68
1.3.1.5. Pārejas gupas metāli.....	69
1.3.1.6. Mieloperoksidāze (MPO) un eozinofilo leikocītu peroksidāze (EPO) .....	71
1.3.1.7. Ksantīnoksidāze (XO).....	71
1.3.1.8. Slāpekļa monoksīds .....	72

1.3.1.9. Tabakas dūmi .....	73
1.3.2. Lipīdu peroksidācijas ķēdes reakcija .....	74
1.3.2.1. Iniciācijas fāze .....	75
1.3.2.2. Pašvairošanās fāze .....	76
1.3.2.3. Nobeiguma fāze .....	77
1.3.3. Antioksidatīvās aizsardzības sistēma .....	78
1.3.3.1. HOPS un antioksidatīvā aizsardzības sistēma .....	80
1.3.3.1.1. Enzimātiskie antioksidanti .....	80
1.3.3.1.1.1. Pastiprināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma .....	80
1.3.3.1.1.2. Vājināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma .....	82
1.3.3.1.1.3. Oksidatīvās tolerances modelis .....	82
1.3.3.1.2. Neenzimātiskie antioksidanti .....	83
1.3.3.2. Bronhiālā astma un antioksidatīvās aizsardzības sistēma .....	83
1.3.3.2.1. Enzimātiskie antioksidanti .....	83
1.3.3.2.1.1. Pastiprināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma .....	83
1.3.3.2.1.2. Vājināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma .....	85
1.3.3.2.2. Neenzimātiskie antioksidanti .....	85
1.4. Proteolītiskie un antiproteolītiskie fermenti .....	86
2. Ierosināto krēpu metode .....	88
2.1. Krēpu ierosināšanas drošība .....	88
2.2. Krēpu ierosināšanas metodes .....	88
2.2.1. Krēpu ierosināšana, izmantojot hipertonusu un izotonisku nātrija hlorīda šķīdumu .....	89
2.2.2. Krēpu ierosināšana, izmantojot uridīna 5'-trifosfātu .....	89
2.3. Krēpu ierosināšanas ietekme uz šūnu sastāvu ierosinātās krēpās .....	89
2.4. Krēpu vākšanas metodes .....	90
2.5. Krēpu apstrādes metodes .....	91
2.6. Datu atkārtojamība .....	92
2.7. Ierosināto krēpu metode salīdzinājumā ar bronhoalveolāro lavāžu un bronhu biopsiju .....	94
3. Darba mērķis .....	96
4. Darba uzdevumi .....	96
Materiāls un metodika .....	97
1. Pacienti .....	97
2. Bronhodilatācijas tests .....	97
3. Bronhoprovokācijas tests .....	98
4. Krēpu ierosināšana .....	99
5. Ierosināto krēpu apstrāde .....	99
6. Asins apstrāde .....	101
7. Biokīmiskās analīzes .....	101
7.1. Katalāzes aktivitātes noteikšana .....	101
7.2. Glutaciona peroksidāzes aktivitātes noteikšana .....	102
7.3. Substrāta oksidējamības noteikšana ar hemiluminescences metodi .....	103
7.4. $\alpha_1$ -antiproteāzes koncentrācijas noteikšana .....	104
7.5. Urīnvielas koncentrācijas noteikšana .....	105
8. Datu statistiskā analīze .....	106
8.1. Lietotie analīžu modeļi un to secība .....	106
8.2. Datu transformācija .....	109
8.2.1. Logaritmiskā transformācija .....	110
8.2.2. Kvadrātsaknes transformācija .....	112

8.2.3. Arksinusa transformācija .....	113
Rezultāti .....	115
1. Citoloģiskie raksturlielumi.....	115
1.1. Smēķēšanas izraisītās pārmaiņas krēpu citoloģiskajos raksturlielos .....	115
1.1.1. Kopējais šūnu skaits krēpās .....	115
1.1.2. Bronhu epitēlijs .....	116
1.1.2.1. Relatīvais bronhu epitēlijšūnu skaits krēpās .....	116
1.1.2.2. Absolūtais bronhu epitēlijšūnu skaits krēpās .....	117
1.1.3. Neitrofilie leukocīti krēpās .....	118
1.1.3.1. Relatīvais neitrofilo leukocītu skaits krēpās .....	118
1.1.3.2. Absolūtais neitrofilo leukocītu skaits krēpās .....	120
1.1.4. Eozinofilie leukocīti krēpās .....	121
1.1.4.1. Relatīvais eozinofilo leukocītu skaits krēpās .....	121
1.1.4.2. Absolūtais eozinofilo leukocītu skaits krēpās.....	122
1.1.5. Makrofāgi krēpās .....	124
1.1.5.1. Relatīvais makrofāgu skaits krēpās.....	124
1.1.5.2. Absolūtais makrofāgu skaits krēpās.....	125
1.1.6. Limfocīti krēpās .....	125
1.1.7. Bazofilie leukocīti krēpās .....	125
1.2. Smēķēšanas izraisītās pārmaiņas asins citoloģiskajos raksturlielos .....	125
1.2.1. Kopējais leukocītu skaits asinīs .....	125
1.2.2. Neitrofilie leukocīti asinīs.....	127
1.2.2.1. Stabiņkodolainie neitrofilie leukocīti.....	127
1.2.2.1.1. Relatīvais stabiņkodolaino neitrofilo leukocītu skaits asinīs..	127
1.2.2.1.2. Absolūtais stabiņkodolaino neitrofilo leukocītu skaits asinīs.	128
1.2.2.2. Segmentkodolainie neitrofilie leukocīti.....	129
1.2.2.2.1. Relatīvais segmentkodolaino neitrofilo leukocītu skaits asinīs	129
.....	129
1.2.2.2.2. Absolūtais segmentkodolaino neitrofilo leukocītu skaits asinīs	131
.....	131
1.2.3. Eozinofilie leukocīti asinīs.....	132
1.1.3.1. Relatīvais eozinofilo leukocītu skaits asinīs .....	132
1.1.3.2. Absolūtais eozinofilo leukocītu skaits asinīs .....	133
1.1.4. Monocīti asinīs .....	134
1.1.4.1. Relatīvais monocītu skaits asinīs .....	134
1.1.4.2. Absolūtais monocītu skaits asinīs .....	134
1.1.5. Limfocīti asinīs .....	136
1.1.5.1. Relatīvais limfocītu skaits asinīs.....	136
1.1.5.2. Absolūtais limfocītu skaits asinīs.....	137
1.1.6. Bazofilie leukocīti asinīs.....	137
2. Bioķīmiskie raksturlielumi.....	137
2.1. Smēķēšanas izraisītās krēpu antioksidatīvā statusā pārmaiņas .....	137
2.1.1. Glutaciona peroksidāzes aktivitāte krēpās.....	137
2.1.2. Katalāzes aktivitāte krēpās.....	139
2.1.3. Krēpu substrāta oksidējamība .....	144
2.2. Smēķēšanas izraisītās asins plazmas antioksidatīvā statusa pārmaiņas .....	145
2.2.1. Glutaciona peroksidāzes aktivitāte asins plazmā.....	145
2.1.2. Asins plazmas substrāta oksidējamība.....	149
2.3. Smēķēšanas izraisītās krēpu un asins urīnvielas koncentrācijas proporcijas pārmaiņas .....	149

2.4. Smēķēšanas izraisītas alfa-1 antiproteāzes koncentrācijas pārmaiņas asins plazmā .....	155
3. Smēķēšanas izraisītas krēpu ierosināšanas ātruma pārmaiņas .....	158
Diskusija .....	160
1. Citoloģiskie raksturlielumi .....	160
1.1. Kopējais šūnu skaits .....	160
1.2. Bronhu epitēlijšūnas .....	161
1.3. Neitrofilie leukocīti .....	163
1.4. Makrofāgi un monocīti .....	165
1.5. Eozinofīlie leukocīti .....	167
1.6. Limfocīti .....	169
1.7. Bazofīlie leukocīti .....	170
2. Bioķīmiskie raksturlielumi .....	170
2.1. Glutaciona peroksidāze .....	170
2.2. Katalāze .....	174
2.3. Substrāta oksidējamība .....	178
2.4. Urīnviela .....	179
2.5. Alfa-1 antiproteāze .....	187
3. Krēpu ierosināšanas ātrums .....	189
Secinājumi .....	193
Pateicība .....	194
Literatūras saraksts .....	195

## Sāsinājumi

ACHY	antihemotripsīns
ADP	adenozīndifosfāts
AP-1	aktivācijas proteīns- 1
askorbāt*	askorbāta monoanjons (C vitamīns)
ATP	adenozīntrifosfāts
BAL	bronhoalveolārā lavāža
Br	broms
BW	bronhu skalojums
CAT	katalāze
Cath-G	G kathepsīns
CC hemokīna eotaksīns	viens no eotaksīniem
CD <sub>3</sub> , CD <sub>4</sub> , CD <sub>8</sub> , CD <sub>11a</sub> , CD <sub>11b</sub> , CD <sub>23</sub> , CD <sub>40L</sub> , CD <sub>40</sub>	skaitliska klasifikācijas sistēma, lai klasificētu uz šūnu (leikocītu u.c.) virsmas ekspresētos antigēnus
CGRP	kalcitonīna gēna atbilstošais peptīds (neuropeptīds)
Cl <sup>-</sup>	hlora anjons
CO	oglekļa monoksīds
CO <sub>2</sub>	oglekļa dioksīds
CSF	cilmšūnu faktors
CysLT(1)R	leikotriēna D <sub>4</sub> receptors
D	Daltons (molekulmasas mērvienība)
DES iDES uDES	desmosīns izodesmosīns urīna desmosīns (elastīna šķelšanas produkti)
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
DTT	ditiotreitols
e <sup>-</sup>	elektrons
ECP	eozinoilo leikocītu katjoniskais proteīns
EDN	eozinoilo leikocītu izcelsmes neirotoksīns
EPO	eozinoilo leikocītu peroksidāze
E selektīns	adhēzijas molekula
ESR	elektronu spinu rezonanses spektroskopija
FAD	flavīnadenīdinukleotīds
FcεRI	augstas afinitātes E imūnglobulīna receptori
FcεRII	zemas afinitātes E imūnglobulīna receptori (CD23)
Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	divvērtīgās un trīsvērtīgās dzelzs joni
(Fe-OH) <sup>4+</sup> , (Fe=O) <sup>5+</sup>	feril radikāļi
FEF <sub>25-75</sub>	forsētās izelpas vidusdaļas vidējais plūsmas ātrums
FEV <sub>1</sub>	forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē
FEV <sub>1</sub> %	forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē procentos no normas
FEV <sub>1</sub> /FVC	Tifno indekss
FMN	flavīnmononukleotīds
FRC	funkcionālā atlieku kapacitāte (mierīgas izelpas beigās plaušās)

	un elpceļos palikušās gāzes tilpums)
FVC,	forsētā vitālā kapacitāte
G-6P-D	glikozo-6-fosfāta dehidrogenāze
G-CSF	granulocītu koloniju stimulācijas faktors
GM-CSF	granulocītu un makrofāgu koloniju stimulācijas faktors
GPx, eGPx	glutaciona un ekstracelulārā glutaciona peroksidāze
GRs	glutaciona reduktāze
GSH	reducētais glutations: mazmolekulārs tripeptīds (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicīns)
GSSG	oksidētais glutations
h	stunda
H <sup>+</sup>	ūdeņraža katjons
H <sub>2</sub> CO	formaldehīds
H <sub>2</sub> O	ūdens
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ūdeņraža peroksīds
HBSS	Henksa buferēts fizioloģiskais šķidrums
HNL	cilvēka neitrofilo leikocītu lipoksigenāze
HO <sup>•</sup>	hidroksilradikālis
HO-1 un HO-2	hēma oksigenāze-1 un -2
HOCl	hipohlorskābe
HOO <sup>•</sup>	hidroperoksilradikālis
HOPS	hroniska obstruktīva plaušu slimība (angliski COPD)
ICAM-1, sICAM-1	intercelulārā šūnu adhēzijas molekula-1 un šķīstošā intercelulārā šūnu adhēzijas molekula-1
IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$	alfa interferons, gamma interferons
IgE	E imūnglobulīns
IGF-I	insulīnam līdzīgais augšanas faktors
IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-2 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL13, IL-16	interleikīni: 1, 1 $\beta$ , 2, 3, 4, 5, 6, 8, 13, 16
K	ķīmiskā reakcijas ātruma konstante, mērvienība: (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) l/moli/ sekundes
G katepsīns, neitrofilu G kathepsīns, makrofāgu B kathepsīns, makrofāgu L kathepsīns, makrofāgu S kathepsīns	leikocītu granulu fermenti
kcal/M	kilokalorijas uz molu (ķīmiskās saites enerģijas mērs)
kD	kilodaltons (molekulmasas mērvienība)
L <sup>•</sup>	lipīda (oglekļa centrēts) radikālis
LH	lipīds
LO <sup>•</sup>	lipīda alkoksilradikālis
LOO <sup>•</sup>	lipīda peroksilradikālis
LOOH	lipīda hidroperoksīds



LOONO	lipīda nitrāts
LOO-OOL	lipīdu tetraoksīds
LTA <sub>4</sub> , LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub>	leikotriēni: A <sub>4</sub> , B <sub>4</sub> , C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub>
MBP	eozinofilo leikocītu galvenais bāziskais proteīns
MCP-1	makrofāgu hemotakses peptīds-1
M-CSF	makrofāgu koloniju stimulācijas faktors
MDA	malondialdehīds
MEF <sub>75</sub> , MEF <sub>50</sub> , MEF <sub>25</sub>	maksimālais izelpas plūsmas ātrums 75, 50, 25 (brīdī, kad plaušās atlicis 75%, 50% un 25% izelpojamā gaisa)
min	minūte
MIP-1 $\alpha$	makrofāgu iekaisuma proteīns-1 alfa
ml	mililitrs
mm Hg	milimetrs dzīvsudraba staba augstuma (spiediena mērvienība)
MMP-2, MMP-9	matriksa metaloproteāzes: 2, 9
MMS-68	makrofāgu izcelsmes gļotu sekrēcijas stimulators-68
M <sup>n+</sup> , M <sup>(n+1)+</sup> , M <sup>(n-1)+</sup>	metāla jons
MPO	mieloperoksidāze
mRNS	matricas ribonukleīnskābe
NaCl	nātrija hlorīds
NADP <sup>+</sup> , NADPH	nikotīnamīdadenīndinukleotīda fosfāta oksidētā un reducētā forma
NAG	N-acetil- $\beta$ -D-glikozaminidāze
NaN <sub>3</sub>	nātrija azīds
NF-kB	nukleārais faktors kapa B
NKA	neirokinīns-A (neuropeptīds)
NKB	neirokinīns-B (neuropeptīds)
NK limfocīti	limfocīti- dabiskās galētājšūnas
NO, NO <sup>•</sup>	slāpekļa monoksīds
NO <sup>2-</sup>	slāpekļpaskābes anjons
NO <sub>2</sub> , NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	slāpekļa dioksīds
NO <sup>3-</sup>	slāpekļskābes anjons
NOS iNOS ecNOS ncNOS	slāpekļa monoksīda sintāze ierosināmā slāpekļa monoksīda sintāze (NOSII) endotēlija konstitucionālā slāpekļa monoksīda sintāze (NOSIII) neironālā konstitucionālā slāpekļa monoksīda sintāze (NOSI)
O <sub>2</sub>	molekulārais skābeklis
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	superoksīda anjona radikālis
O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	peroksīda anjons
O <sub>3</sub>	ozons
OH <sup>-</sup>	hidroksīdanjons
ONOO <sup>-</sup>	peroksinitrīta anjons
ONOOH	slāpekļskābe
PAF, lyso-PAF	trombocītu aktivācijas faktors un tā modificēta forma
PC <sub>20</sub>	provokācijas ierosinātāja koncentrācija, kuras gadījumā FEV <sub>1</sub>

	samazinājies par 20% pirmsiedarbības līmeņa
PD <sub>20</sub>	provokācijas ierosinātāja kumulatīvā deva miligramos, kuras gadījumā FEV <sub>1</sub> samazinājies par 20% pirmsiedarbības līmeņa
PDGF-β	trombocītu izdalītais β augšanas faktors
PEF	izelpas maksimumplūsma
PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub>	prostaglandīni: E <sub>2</sub> , D <sub>2</sub>
PiMM	homozigotisks MM (normālais) α <sub>1</sub> antitripsīna gēna fenotips
PiZZ	homozigotisks ZZ alēļu α <sub>1</sub> antitripsīna gēna fenotips
PiMZ	heterozigotisks MZ alēļu α <sub>1</sub> antitripsīna gēna fenotips
PNTS <sup>o</sup>	polinepiesātinātās taukskābes radikālis
PNTS-H	polinepiesātinātā taukskābe
Q10	Q10 koenzīms (ubihinons-10)
RANTES	normālu T šūnu ekspresētais un sekretētais aktivācijas paaugstinātājs
R-NH <sub>2</sub> un R'-NH <sub>2</sub>	aminoskābes u.c. amīni
RO <sup>o</sup>	alifātisks alkoksilradikālis
ROS	aktīvie skābekļa savienojumi
Se	selēns
-SH, -S-H	sulfhidrilgrupa
SLPI	sekretorisks leukoproteāžu inhibitors
SO <sub>2</sub>	sēra dioksīds
SOD, Cu-Zn-SOD, Mn-SOD	superoksīda dismutāzes: vara, cinka un mangāna
SP	P substance (neuropeptīds)
TGF-α, TGF-β, TGF-β <sub>1</sub>	transformējošās augšanas faktori: alfa, bēta un bēta-1
Th1, Th2	T līdzētājšūnu limfocīti: 1. un 2. tips
TIMP-1	audu metaloproteāzes inhibitors-1
TLC	plaušu totālkapacitāte (gāzes tilpums plaušās un elpceļos pēc pilnas ieelpas)
TNF-α	audzēja nekrozes alfa faktors
TNF-β	audzēja nekrozes bēta faktors
TxB <sub>2</sub>	tromboksāns B <sub>2</sub>
VCAM-1	vaskulārā šūnu adhēzijas molekula-1
VEGF	vaskulārais endoteliālais augšanas faktors
VLA-1	ļoti vēlais antigēns-1
VLA-4	ļoti vēlais antigēns-4 (adhēzijas molekulas)
X <sup>o</sup>	pašvairošanos pārtraucošais radikālis
XD	ksantīndehidrogenāzes
xg	reiz Zemes gravitācijas paātrinājums (9,81ms <sup>-2</sup> )
XO	ksantīnoksidāze
α <sub>1</sub> -antitripsīns	alfa-1 antitripsīns (antiproteāze)
αTOH αTO <sup>o</sup>	alfa tokoferols- reducēts un oksidēts (E vitamīns)
β <sub>1</sub> -integrīns	bēta-1 integrīns (adhēzijas molekula)
β <sub>2</sub> agonisti	β <sub>2</sub> adrenoreceptoru agonisti
γ-TOH	gamma tokoferols
ΔE <sup>o</sup>	viena elektrona standart redukcijas potenciāls, kā arī šis

$\Delta E^{\circ}_{pH7}$	potenciāls pH-7 gadījumā– mērvienība- volts (V)
$\mu\text{g}$ .	mikrogramms
$\mu\text{M}$	mikromols
$\varepsilon$	molārās ekstinkcijas koeficients (mērvienība $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
$\lambda$	gaismas viļņa garums
$^{14}\text{C}$ -urea	ar oglekļa 14- izotopu iezīmēta urīnviela
$^3\text{HOH}$	ar ūdeņraža 3- izotopu tritiju iezīmēts ūdens
5-HETE 12-HETE	5-hidroksieikozatetraenoiskābe 12-hidroksieikozatetraenoiskābe
8-izo-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	izoprostāns
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA	99.m tehnēcija izotops, kas saistīts ar dietilēntriāmīna pentacetātu

### Statistikas saīsinājumi

ANCOVA	kovariācijas analīze ( <i>analysis of covariance</i> )
ANOVA	dispersijas analīze ( <i>analysis of variance</i> )
$b_0$	vienādojuma ( <i>taisnes, līknes, plaknes, hiperplaknes</i> ) brīvais loceklis
$b_1, b_2, b_3, b_4$	vienādojuma ( <i>taisnes, līknes, plaknes, hiperplaknes</i> ) virziena koeficients
EKASHP modelis	eksponenciālās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis ( <i>exponential analysis of covariance- ANCOVA homogeneity- of-slope model</i> )
EKKA modelis	eksponenciālās klasiskās kovariācijas analīzes modelis ( <i>exponential analysis of covariance- ANCOVA analysis of covariance model</i> )
GLM	vispārējais lineārais modelis ( <i>general linear model</i> )
GLZ	vispārējais linearizējamais modelis ( <i>general linearized model</i> )
LGKASHP modelis	logaritmiskās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis ( <i>logarithmic analysis of covariance- ANCOVA homogeneity- of-slope model</i> )
LKASHP modelis	lineārās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis ( <i>linear analysis of covariance- ANCOVA homogeneity- of-slope model</i> )
$\log_{10}$	decimāllogaritms
NDA modelis	nelineārās dispersijas analīzes modelis ( <i>nonlinear analysis of variance ANOVA</i> )
p	varbūtība (ka apgalvojums ir kļūdainis)
PAKASHP modelis	pakāpes kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis ( <i>power analysis of covariance- ANCOVA homogeneity- of-slope model</i> )
PKASHP modelis	polinomālās (paraboliskās) kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis ( <i>polynomial (parabolic) analysis of covariance- ANCOVA</i> )

	<i>homogeneity- of- slope model</i>
PKKA modelis	polinomālās (paraboliskās) klasiskās kovariācijas analīzes modelis <i>(polynomial (parabolic) analysis of covariance- ANCOVA analysis of covariance model)</i>
r	korelācijas koeficients
R <sub>i</sub>	i klases iekšējais korelācijas koeficients
r <sup>2</sup>	determinācijas koeficients, kas raksturo faktora ietekmes īpatsvaru
sin	sinuss
SKASHP modelis	sinusa kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis <i>(sine analysis of covariance- ANCOVA homogeneity- of- slope model)</i>
SKKA modelis	sinuisa klasiskās kovariācijas analīzes modelis <i>(sine analysis of covariance- ANCOVA analysis of covariance model)</i>
X, Y, Z.....vai X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub> .....	faktors
X', Y', Z'....vai X <sub>1</sub> ', X <sub>2</sub> ', X <sub>3</sub> '....	transformēts faktors
X <sub>i</sub> , Y <sub>i</sub> Z <sub>i</sub>	novērotās variāntes
$\hat{X}_i \hat{Y}_i \hat{Z}_i$	aprēķinātās variāntes

## Kopsavilkums

Ir zināms, ka smēķēšana ir viens no galvenajiem plaušu slimību veicinošiem faktoriem. Smēķēšanas ietekme pārsvarā pētījumu ir tikusi vērtēta starp diskrētām grupām – nesmēķējošiem un smēķējošiem veseliem cilvēkiem un slimniekiem, kas neatļauj izdarīt secinājumus par smēķēšanas kvantitatīvu ietekmi uz patoloģisku pārmaiņu attīstības gaitu. Turpretī mēs nolēmām pētīt kā smēķēšanas stāžs, izteikts pakgados, ietekmē elpceļu iekaisuma intensitāti bronhiālās astmas un HOPS slimniekiem un ar ko tas atšķiras no procesiem, kas notiek veselu cilvēku elpceļos smēķēšanas dēļ. Kā iekaisuma procesa indikatorus mēs izmantojām šūnu spektru un antioksidantu aktivitāti ierosinātās krēpās un asinss plazmā.

Pētījumā iekļāvām 38 veselus cilvēkus, 30 HOPS un 29 bronhiālās astmas slimniekus ar dažādu smēķēšanas stāžu (0-50 pakgadi).

Visiem pētījumā iekļautajiem cilvēkiem spirometriski noteicām FVC, FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/FVC un bronhodilatācijas testu ar Salbutamolu nosakot šo rādītāju reversibilitāti. Daļai cilvēku, kam ārējās elpošanas rādītāji to pieļāva, veicām bronhoprovokācijas testu ar metaholīnu un aprēķinājām PD<sub>20</sub>. Krēpas ierosinājām 4% NaCl šķīdumu inhalējot ar ultrskaņas inhalatoru. Ierosinātās krēpas šķēlām ar 0,01 M DTT šķīdumu HBSS. Šūnu spektru noteicām gan krēpās, gan venozajās asinīs. Kopējo šūnu skaitīšanu veicām Neibauera kamerā. Diferenciālo šūnu skaitīšanu katram paraugam veicām no diviem ar Meja-Grīnvalda-Gimzas metodi krāsotiem uztriepes preparātiem. Ierosināto krēpu supernatantā noteicām glutaciona peroksidāzes (GPx) un katalāzes (CAT) aktivitāti, substrāta oksidējamību (S) un urīnvielas koncentrāciju. Asins plazmā noteicām GPx aktivitāti, S, urīnvielas un  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrāciju. Substrāta oksidējamību (S) noteicām ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ierosinātu, luminolatkarīgo hemiluminiscences metodi un tā raksturo kopējo antioksidatīvo aizsardzības spēju. Krēpu ierosināšanas ātrumu (V) noteicām izmantojot krēpu daudzumu gramos, kas tiek iegūts vienā krēpu ierosināšanas minūtē. Urīnvielu izmantojām par bronhu epitēlija caurlaidības raksturlielumu un izteicām kā proporciju %. Urīnvielas relatīvā koncentrācija = urīnviela krēpās / urīnviela asinīs. Datus statistiski analizējām ar lineāro un nelineāro daudzfaktoru dispersijas, kovariācijas un regresijas analīzi. Datu normalizēšanai izmantojām arksinusa, kvadrātsaknes un logaritmisko transformāciju.

Mēs atklājām, ka bronhu epitēlijsūnu relatīvais skaits krēpās neatšķiras veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem un smēķēšanas stāžam pieaugot vienādi būtiski mazinās  $r^2=22,3\%$ ,  $r=0,472$ ,  $p=0,000048$ . Bronhu epitēlijsūnu absolūtais skaits krēpās neatšķiras veseliem cilvēkiem, HOPS un astmas slimniekiem un smēķēšanas stāžam pieaugot vienādi būtiski mazinās  $r^2=11,4\%$ ,  $r=0,337$ ,  $p=0,00084$ . Neitrofilo leukocītu relatīvais skaits krēpās HOPS slimniekiem ir būtiski lielāks nekā veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem ( $p=0,0012$ ,  $p=0,0011$ ) un smēķēšanas stāžam pieaugot būtiski palielinās veseliem cilvēkiem  $r^2=16,7\%$ ,  $r=0,408$ ,  $p=0,012$ , HOPS  $r^2=16,1\%$ ,  $r=0,402$ ,  $p=0,028$  un astmas slimniekiem  $r^2=30,0\%$ ,  $r=0,548$ ,  $p=0,0021$ . Neitrofilo leukocītu absolūtais skaits krēpās HOPS slimniekiem arī ir būtiski lielāks nekā veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem, kuriem tas neatšķiras ( $p=0,0103$ ) un smēķēšanas stāžam pieaugot būtiski palielinās visām trim grupām vienādi  $r^2=21,4\%$ ,  $r=0,463$ ,  $p=0,00031$ . Eozinofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits krēpās astmas slimniekiem ir būtiski lielāks nekā veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem, kuriem tas neatšķiras ( $p<0,0000000001$ ) un smēķēšanas stāžam pieaugot vienādi būtiski pieaug veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem (relatīvais  $r^2=21,2\%$ ,  $r=0,460$ ,  $p=0,00012$ , absolūtais  $r^2=22,3\%$ ,  $r=0,472$ ,  $p=0,000055$ ). Makrofāgu relatīvais skaits krēpās HOPS slimniekiem ir būtiski mazāks nekā veseliem cilvēkiem ( $p=0,0022$ ) un smēķēšanas stāžam pieaugot vienādi būtiski mazinās veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem  $r^2=11,5\%$ ,  $r=-0,339$ ,  $p=0,018$ , bet būtiskāk astmas slimniekiem  $r^2=30,7\%$ ,  $r=-0,554$ ,  $p=0,0022$ . Stabiņkodolaino leukocītu relatīvais un absolūtais skaits asinīs neatšķiras visām trim grupām un smēķēšanas stāžam pieaugot visām grupām vienādi būtiski pieaug (relatīvais  $r^2=14,4\%$ ,  $r=0,379$ ,  $p=0,0018$ , absolūtais  $r^2=26,2\%$ ,  $r=0,512$ ,  $p=0,000065$ ). Segmentkodolaino leukocītu relatīvais un absolūtais skaits asinīs neatšķiras nevienai pētītajai cilvēku grupai ja smēķēšanas stāžs ir mazs. Smēķēšanas stāžam pieaugot vienādi būtiski pieaug relatīvais segmentkodolaino leukocītu skaits asinīs HOPS un astmas slimniekiem  $r^2=17,2\%$ ,  $r=0,415$ ,  $p=0,0014$ , kas būtiski  $p=0,021$  atšķiras no veseliem cilvēkiem, kam izmaiņas nekonstatēja. Smēķēšanas stāžam pieaugot būtiski pieaug absolūtais segmentkodolaino leukocītu skaits asinīs HOPS slimniekiem  $r^2=37,9\%$ ,  $r=0,616$ ,  $p=0,00081$ , kas būtiski  $p=0,028$  atšķiras no veseliem cilvēkiem, kam izmaiņas nekonstatēja. Ticama smēķēšanas ietekmi uz eozinofilo leukocītu relatīvo un absolūto skaitu asinīs nekonstatējām. Eozinofilo leukocītu relatīvais skaits būtiski lielāks astmas slimniekiem  $4,3\%$  ( $2,8 - 6,1\%$ ) nekā veseliem cilvēkiem  $1,8\%$  ( $1,2 - 2,5\%$ )  $p=0,0018$  un HOPS slimniekiem

1,8 (1,0 – 2,8%)  $p=0,0042$ , bet absolūtais  $289 \text{ n/mm}^3$  ( $185 - 414 \text{ n/mm}^3$ ) - nekā veseliem cilvēkiem  $116 \text{ n/mm}^3$  ( $71 - 171 \text{ n/mm}^3$ )  $p=0,011$ . GPx aktivitāte krēpās HOPS slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu ir būtiski lielāka nekā veseliem cilvēkiem ( $p=0,00002$ ) un astmas slimniekiem ( $p=0,00005$ ), bet smēķēšanas stāžam pieaugot būtiski mazinās  $r^2=38,9\%$ ,  $r=-0,624$ ,  $p=0,0011$ , kas būtiski  $p=0,00069$ ,  $p=0,00073$  atšķiras no abām pārējām grupām, kam izmaiņas nekonstatē. CAT aktivitāti krēpās HOPS slimniekiem būtiski pozitīvi ietekmē neitrofilo leukocītu absolūtais skaits ( $r^2=34,3\%$ ,  $p=0,00038$ ), GPx aktivitāte ( $r^2=16,0\%$ ,  $p=0,0088$ ) un S ( $r^2=11,8\%$ ,  $p=0,021$ ) krēpā. CAT aktivitāti krēpās veseliem cilvēkiem būtiski pozitīvi ietekmē neitrofilo leukocītu absolūtais skaits krēpās ( $r^2=19,1\%$ ,  $p=0,0088$ ). CAT aktivitāti krēpās astmas slimniekiem būtiski pozitīvi ietekmē eozinofilo leukocītu ( $r^2=21,4\%$ ,  $p=0,011$ ) un negatīvi limfocītu ( $r^2=14,3\%$ ,  $p=0,034$ ) absolūtais skaits krēpā. Tika konstatēta tendence būt palielinātai krēpu S HOPS slimniekiem salīdzinot ar veseliem cilvēkiem  $p=0,054$ , 45,8 n. v. (29,4 – 71,5 n. v.) un 21,8 n. v. (13,7 – 34,9 n. v.). Plazmas GPx aktivitāte starp grupām neatšķirās maza smēķēšanas stāža gadījumā, bet smēķēšanas stāžam pieaugot būtiski palielinājās HOPS slimniekiem  $r^2=17,7\%$ ,  $r=0,421$ ,  $p=0,032$ . GPx aktivitāti plazmā astmas slimniekiem būtiski pozitīvi ietekmē monocītu ( $r^2=16,5\%$ ,  $p=0,022$ ), un limfocītu ( $r^2=20,6\%$ ,  $p=0,011$ ) absolūtais skaits asinīs, bet negatīvi šo faktoru mijiedarbība ( $r^2=16,1\%$ ,  $p=0,023$ ). Urīnvielas relatīvā koncentrācija HOPS slimniekiem ir nedaudz lielāka nekā veseliem cilvēkiem ( $p=0,069$ ) un smēķēšanas stāžam pieaugot būtiski vienādi palielinās šīm abām grupām  $r^2=30,6\%$ ,  $r=0,553$ ,  $p=0,0003$ . Urīnvielas relatīvā koncentrācija HOPS slimniekiem ir būtiski lielāks nekā veseliem cilvēkiem ( $p=0,00094$ ) un astmas slimniekiem ( $p=0,015$ ) vājas krēpu GPx aktivitātes gadījumā, bet GPx aktivitātei pieaugot būtiski samazinās HOPS slimniekiem  $r^2=29,9\%$ ,  $r=-0,547$ ,  $p=0,010$ .  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija plazmā grupām neatšķirās un smēķēšanas stāžam pieaugot vienādi būtiski palielinās veselu cilvēku un HOPS grupā  $r^2=23,7\%$ ,  $r=0,487$ ,  $p=0,0047$ .  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija plazmā būtiski pieaug palielinoties neitrofilo leukocītu skaitam krēpās HOPS slimniekiem  $r^2=38,2\%$ ,  $r=0,618$ ,  $p=0,024$ . Krēpu ierosināšanas ātrums HOPS slimniekiem ir būtiski lielāks nekā veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem ( $p=0,010$ ,  $p=0,049$ ) bet smēķēšanas stāžam pieaugot būtiski palielinās veseliem cilvēkiem  $r^2=19,4\%$ ,  $r=0,441$ ,  $p=0,017$ , un astmas slimniekiem  $r^2=28,1\%$ ,  $r=0,530$ ,  $p=0,00054$ .

HOPS slimniekiem ir palielināts krēpu neitrofilo leukocītu absolūtais un relatīvais skaits un ierosināšanas ātrums, kas liecina par pastiprinātu neitrofilo iekaisumu un gļotu dziedzeru aktivitāti elpceļos. Smēķēšana palielina krēpu neitrofilo, asins stabiņkodolaino leukocītu relatīvo un absolūto skaitu un  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrāciju gan veseliem cilvēkiem, gan HOPS un astmas slimniekiem. Smēķēšana palielina krēpu eozinofilo leukocītu relatīvo un absolūto skaitu, kā arī urīnvielas relatīvo koncentrāciju veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem. Turpretī astmas slimniekiem ir palielināts eozinofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits krēpās, ko smēķēšana neietekmē. No tā izriet, ka smēķēšana pastiprina elpceļu neitrofilo iekaisumu un leukopoēzi kaulu smadzenēs gan veseliem cilvēkiem, gan HOPS un astmas slimniekiem, bet elpceļu eozinofilo iekaisumu un epitēlija caurlaidību - arī veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem. Savukārt astmas slimniekiem jau tā izteikti eozinofilo iekaisumu smēķēšana tālāk neietekmē. Nesmeķējošiem HOPS slimniekiem krēpu GPx aktivitāte ir paaugstināta, bet smēķēšanas ietekmē tā tiek nomākta. Savukārt plazmas GPx aktivitāte pieaug smēķēšanas rezultātā. Palielinoties krēpu neitrofilo leukocītu skaitam un substrāta oksidējamībai palielinās arī CAT aktivitāte HOPS slimniekiem. Tas norāda uz iekaisuma izsaukto glutaciona antioksidatīvās aizsardzības aktivāciju, kuru nomāc smēķēšanas izraisītā papildus oksidatīvā slodze elpceļos, kaut arī organisma vispārējā antioksidatīvā aktivitāte palielinās.



## Summary

It is well known, that smoking is important risk factor of a variety of lung diseases. In previous investigations the influence of smoking was evaluated predominantly in discrete groups of non-smoking or smoking patients, that did not allow to get information on the quantitative effect of smoking on the development of pathologic changes in the lungs. In our study we investigated the gradual influence of smoking history measured in pack-years on airways inflammation in patients with asthma, chronic obstructive pulmonary disease and healthy persons. As an indicator of inflammatory process we used the changes in cell spectrum and antioxidant level of induced sputum and blood plasma.

30 patients with chronic obstructive pulmonary disease, 29 patients with asthma and 38 healthy volunteers with different smoking history (0 – 50 packyears) were included in our trial.

Lung function and bronchodilation test with salbutamol was performed during trial. Bronchial provocation test with metacholine was performed and cumulative provocative dose was calculated in patients with  $FEV_1 > 60\%$ . Sputum induction was performed with 4% NaCl solution from ultrasound nebulizer. Induced sputum was further processed with 0.01 M dithiothreitol in Henks buffered saline. Cell spectrum was detected in induced sputum and venous blood. Total cell count was performed in standard Neubauer hemocytometer. Treated samples were stained with May-Grünvald-Giemsa. Differential cell count was calculated from two slides. Activity of glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), substrate oxidibility (S) and urea concentration was measured in supernatant of induced sputum. In peripheral blood activity of eGPx and  $\alpha_1$ -antitrypsin, S, urea concentration was measured. Measurement of CAT and eGPx activity was made spectrophotometrically. S was detected with  $H_2O_2$  induced luminol dependent hemiluminiscence method. Sputum induction rate (V) was expressed as a sputum mass obtained from patient during one minute. In our trial urea concentration was used as airways epithelium permeability marker that was expressed as the proportion of urea in sputum to urea in peripheral blood given in percentages. Multifactorial linear and non-linear analysis of covariance, variance and regression was used to make statistical analysis of obtained

data. Data normalization was performed with arcsine, square root and logarithmic transformation.

We found that relative sputum bronchial epithelium cell count decreased with increasing of the smoking history ( $r^2=22.3\%$ ,  $r=0.472$ ,  $p=0.000048$ ) and do not differ among healthy volunteers and COPD patients. Absolute sputum bronchial epithelium cell count was similar in patients with COPD, asthma and control group. We observed similar decrease in bronchial epithelium cell count with increase of smoking history ( $r^2=11.4\%$ ,  $r=0.337$ ,  $p=0.00084$ ). Relative neutrophil count in induced sputum was significantly higher in patients with COPD compared to asthmatics and control group ( $p=0.0011$  and  $p=0.0012$  respectively). The increase of smoking history was associated with increase of sputum neutrophilia in COPD patients ( $r^2=16.1\%$ ,  $r=0.402$ ,  $p=0.028$ ), as well as asthmatics ( $r^2=30.0\%$ ,  $r=0.548$ ,  $p=0.0021$ ) and healthy volunteers ( $r^2=16.7\%$ ,  $r=0.408$ ,  $p=0.012$ ). Absolute sputum neutrophil count was significantly higher in patients with COPD compared to both other groups ( $p=0.0103$ ). Increase of smoking history induced the increase of airway neutrophilia in all study groups ( $r^2=21.4\%$ ,  $r=0.463$ ,  $p=0.00031$ ). Both absolute and relative sputum eosinophil count was significantly higher in asthmatics compared to COPD patients and healthy people ( $p<0.0000000001$ ). We found smoking history dependent increase of sputum eosinophilia in patients with COPD and healthy volunteers (relative count  $r^2=21.2\%$ ,  $r=0.460$ ,  $p=0.00012$ , absolute count  $r^2=22.3\%$ ,  $r=0.472$ ,  $p=0.000055$ ). Relative sputum macrophage count was significantly lower in COPD patients compared to healthy volunteers ( $p=0.0022$ ). Smoking induced decrease of relative macrophage count in asthmatics ( $r^2=30.7\%$ ,  $r=-0.554$ ,  $p=0.0022$ ) and COPD and healthy people groups joined together ( $r^2=11.5\%$ ,  $r=-0.339$ ,  $p=0.018$ ). Relative and absolute blood band leukocyte count was similar in all patient groups with low smoking history, however in heavy smokers of all study groups the band leukocytes count increased (relative count  $r^2=14.4\%$ ,  $r=0.379$ ,  $p=0.0018$ ; absolute count  $r^2=26.2\%$ ,  $r=0.512$ ,  $p=0.000065$ ). Relative and absolute blood Segmented neutrophil count also didn't differ in study groups with low smoking history. In joined patients group with heavy smoking COPD and asthma patients was observed an increase in relative blood neutrophilia (relative count  $r^2=17.2\%$ ,  $r=0.415$ ,  $p=0.0014$ ) compared to healthy volunteers ( $p=0.021$ ). Absolute blood segmented neutrophil count significantly increased with smoking history only in COPD patients ( $r^2=37.9\%$ ,  $r=0.616$ ,  $p=0.00081$ ) compared to healthy volunteer group (difference between groups

$p=0.028$ ). We did not observe significant influence of smoking history on blood eosinophilia. Relative blood eosinophilia was significantly higher in asthma patients 4.3% (2.8 – 6.1%) compared to healthy volunteers 1.8% (1.2 – 2.5%;  $p=0.0018$ ) and COPD 1.8% (1.0% - 2.8%;  $p=0.0042$ ). The same was true for the absolute eosinophil leukocyte count – in asthma patients 289 cells/mm<sup>3</sup> (185 – 414 cell/mm<sup>3</sup>) and healthy subjects 116 cells/mm<sup>3</sup> (71 – 171 cell/mm<sup>3</sup>; difference between groups,  $p=0.011$ ). Activity of sputum GPx was significantly higher in low smoking history COPD group compared to asthmatics ( $p=0.00005$ ) and control group ( $p=0.00002$ ). In COPD group with longer smoking history progressive decrease of sputum GPx occurred ( $r^2=38.9\%$ ,  $r=-0.624$ ,  $p=0.0011$ ), however such influence was not observed in asthma and healthy volunteer groups. The difference between COPD and asthmatics -  $p=0.00073$  and between COPD and healthy volunteers  $p=0.00069$ . We observed that in COPD group sputum CAT level was positively influenced by sputum neutrophil absolute count ( $r^2=34.3\%$ ,  $p=0.00038$ ), GPx activity ( $r^2=16.0\%$ ,  $p=0.0088$ ) and substrate oxydability ( $r^2=11.8\%$ ,  $p=0.021$ ). In healthy volunteer group CAT activity was positively influenced only by sputum absolute neutrophil count ( $r^2=19.1\%$ ,  $p=0.0088$ ). In asthmatics group CAT activity was positively influenced by absolute sputum eosinophil count ( $r^2=21.4\%$ ,  $p=0.011$ ) and negatively influenced by sputum lymphocyte count ( $r^2=14.3\%$ ,  $p=0.034$ ). We found a trend to significantly higher sputum S in patients with COPD compared to control group ( $p=0.054$ ). Plasma GPx activity did not differ in all patient groups with low smoking history. In COPD patients with long smoking history GPx activity was increased significantly ( $r^2=17.7\%$ ,  $r=0.421$ ,  $p=0.032$ ). In asthma patients plasma GPx activity was influenced positively by absolute blood monocyte count ( $r^2=16.5\%$ ,  $p=0.022$ ) or lymphocyte ( $r^2=20.6\%$ ,  $p=0.011$ ) count. Lymphocyte and monocyte count if taken together influence negatively plasma GPx level ( $r^2=16.1\%$ ,  $p=0.023$ ). Sputum/plasma urea fraction in COPD patients had a trend to higher values compared to healthy patients ( $p=0.069$ ). Longer smoking history induced a rise in urea fraction that was observed in both patients groups ( $r^2=30.6\%$ ,  $r=0.553$ ,  $p=0.0003$ ). Low sputum GPx activity was associated with significantly higher urea fraction in COPD group compared to control group ( $p=0.00094$ ) and asthma patients ( $p=0.015$ ). Increase of GPx activity in COPD patients was associated with progressive decrease of sputum/plasma urea fraction ( $r^2=29.9\%$ ,  $r=-0.547$ ,  $p=0.010$ ). Plasma  $\alpha_1$ -antitrypsin concentration did not differ

among examined groups and increased in parallel with increasing smoking history in patients with COPD and control group ( $r^2=23.7\%$ ,  $r=0.487$ ,  $p=0.0047$ ). Plasma  $\alpha_1$ -antitrypsin had positive relationship with sputum neutrophilia in COPD group ( $r^2=38.2\%$ ,  $r=0.618$ ,  $p=0.024$ ). Sputum induction rate was significantly higher in COPD group compared to asthmatics and control patients ( $p=0.049$  and  $p=0.010$  respectively). Smoking history influenced positively sputum induction rate in asthmatic patients and healthy volunteers ( $r^2=28.1\%$ ,  $r=0.530$ ,  $p=0.00054$ ) ( $r^2=19.4\%$ ,  $r=0.441$ ,  $p=0.017$ ), but not – in COPD patients.

In summary, enhanced secretory activity of mucous glands and neutrophilic inflammation in airways of COPD patients is associated with increased relative and absolute sputum neutrophilia and sputum induction rate. Smoking increases sputum neutrophilia, induces blood leukocyte formula left shift, and elevates plasma  $\alpha_1$ -antitrypsin level in all patients groups. Relative and absolute sputum eosinophil count and sputum/plasma urea fraction relates positively with smoking history in healthy subjects and COPD patients. Smoking has no further influence on eosinophilic inflammation in asthmatic patients. It leads to conclusion that smoking enhances neutrophilic inflammation and leucopoiesis in bone marrow in all patients and healthy subjects. With increasing the smoking history both eosinophilic inflammation and airways permeability become enhanced that is characteristic for COPD patients and asymptomatic smokers. Smoking does not further influence airways eosinophilic inflammation that is active in asthmatic airways. Non-smoking COPD patients has increased lung GPx activity, but smoking induces progressive decline of the enzyme activity. In the same time smoking stimulates blood GPx activity. Activated airways neutrophilic inflammation and substrate oxidability stimulates also CAT activity in COPD patients.

## Kopsavilkums krieviski

### Резюме

Известно, что курение является одним из главных факторов развития хронической заболеваний легких. Большинство исследований влияния курения проводились между сравнения дискретными группами – курящих и некурящих здоровых и больных людей, что не дают возможность судить о количественном влиянии курения на развитие патологических процессов в легкую. Напротив, мы решили исследовать, как стаж курения выраженный в в пачко-годах, влияет на развитие воспаления в дыхательных путях у больных бронхиальной астмой и ХОБЛ и какого отличие от процессов, происходящих в дыхательных путях у здоровых людей под влиянием курения. О воспалительном процессе в легких судили по клеточном спектру и активности антиоксидативных ферментов в вызванной мокроте больных.

Исследование включало 38 здоровых людей, 30 больных с ХОБЛ и 29 больных бронхиальной астмой, с разным стажем курения.

Всем, включенным в исследование, были спирометрически определены ФЖЕЛ, ОФВ<sub>1</sub>, индекс Тифно, бронходилатационный тест с Салбутамолом и определена реверсивность этих показателей. Отдельной группе исследуемых, чьи показатели внешнего дыхания позволяли, проводили бронхопровокационный тест с метахолином и рассчитали  $PD_{20}$ . Вызывание выделения мокроты производилось ингаляцией 4% р-ра NaCl с помощью ультразвукового ингалятора. Расщепление мокроты проводилось 0.01 М дитиотретола. Клеточный спектр был определен как в мокроте, так и в венозной крови. Общее количество клеток подсчитывалось в камере *Neubauer*. Дифференциальный подсчет клеток в каждом образце (пробе) проводился из двух препаратов-мазков, окрашенных методом *May-Grunwald-Giemsa*. В супернатанте мокроты определяли активность пероксидазы глутатиона (GPx) и каталазы (CAT), окисляемость субстрата (S) и концентрацию мочевины. В плазме крови определялись активность глутатион-пероксидазы (GPx), S, концентрация мочевины и концентрация  $\alpha$ 1-антитрипсина. Окисляемость субстрата (S) определялась методом люминол-зависимой гемилюминисценции, возбужденной при помощи перекиси водорода, характеризующей общий антиоксидативный потенциал материала. Скорость выделения мокроты (V)

определяли в граммах в минуту. Мочевину применили в виде индикатора проницаемости способности эпителия бронхов и рассчитывали соотношение концентрации мочевины в мокроте к ее концентрации в крови. Данные были обработаны, используя линейный, не линейный многофакторный дисперсионный, ковариационный и регрессионный анализ. Для нормализации данных была использована трансформация методом арксинуса, квадратного корня а также логарифмическая трансформация.

Выявили, что относительное число покровного эпителия бронхов у здоровых людей и у больных ХОБЛ не отличается и, с продолжительностью курения достоверно уменьшается ( $r^2=22,3\%$ ,  $r=0,472$ ,  $p=0,000048$ ). Абсолютное число покровного эпителия бронхов у здоровых людей и у больных ХОБЛ и у больных бронхиальной астмой не отличалась и, с продолжительностью курения достоверно уменьшалась  $r^2=11,4\%$ ,  $r=0,337$ ,  $p=0,00084$ . Относительное число нейтрофильных лейкоцитов в мокроте у больных ХОБЛ было достоверно больше чем у здоровых людей и у больных бронхиальной астмой ( $p=0,0012$ ,  $p=0,0011$ ) и, с продолжительностью курения достоверно увеличивалась у здоровых людей ( $r^2=16,7\%$ ,  $r=0,408$ ,  $p=0,012$ ), ХОБЛ ( $r^2=16,1\%$ ,  $r=0,402$ ,  $p=0,028$ ) и у больных бронхиальной астмой ( $r^2=30,0\%$ ,  $r=0,548$ ,  $p=0,0021$ ). Абсолютное число нейтрофильных лейкоцитов в мокроте у больных ХОБЛ было достоверно больше чем у здоровых людей и у больных бронхиальной астмой у которых они были одинаковы ( $p=0,0103$ ) и, с продолжительностью курения достоверно увеличивались у представителей всех групп  $r^2=21,4\%$ ,  $r=0,463$ ,  $p=0,00031$ . Абсолютное и относительное число эозинофильных лейкоцитов в мокроте у больных бронхиальной астмой было достоверно больше чем у здоровых людей и у больных ХОБЛ у которых они были одинаковы ( $p<0,0000000001$ ) и, с продолжительностью курения достоверно увеличивались как у здоровых людей так и у больных ХОБЛ (относительное  $r^2=21,2\%$ ,  $r=0,460$ ,  $p=0,00012$ , абсолютное  $r^2=22,3\%$ ,  $r=0,472$ ,  $p=0,000055$ ). Относительное число макрофагов в мокроте у больных ХОБЛ было достоверно меньше чем у здоровых людей ( $p=0,0022$ ) и, с продолжительностью курения достоверно уменьшались как у здоровых людей так и у больных ХОБЛ ( $r^2=11,5\%$ ,  $r=-0,339$ ,  $p=0,018$ ), но было более выражено у больных бронхиальной астмой  $r^2=30,7\%$ ,  $r=-0,554$ ,  $p=0,0022$ . Абсолютное и относительное число палочко-ядерных лейкоцитов в крови достоверно не отличалось у представителей всех групп и, с

продолжительностью курения достоверно увеличивалось (относительное  $r^2=14,4\%$ ,  $r=0,379$ ,  $p=0,0018$ , абсолютное  $r^2=26,2\%$ ,  $r=0,512$ ,  $p=0,000065$ ). Абсолютное и относительное число палочко-ядерных лейкоцитов в крови при маленьком стаже курения достоверно не отличалось у представителей всех групп. Пропорционально стажу курения, достоверно увеличивалось относительное число палочко-ядерных лейкоцитов в крови у больных ХОБЛ и у больных бронхиальной астмой  $r^2=17,2\%$ ,  $r=0,415$ ,  $p=0,0014$ , что достоверно  $p=0,021$  отличалось от здоровых людей. Пропорционально стажу курения, достоверно увеличивалось абсолютное число палочко-ядерных лейкоцитов в крови у больных ХОБЛ  $r^2=37,9\%$ ,  $r=0,616$ ,  $p=0,00081$ , что достоверно  $p=0,028$  отличалось от здоровых людей. Достоверного влияния курения на абсолютное и относительное число эозинофильных лейкоцитов в крови не обнаружили. Относительное число эозинофильных лейкоцитов в крови было достоверно больше у больных бронхиальной астмой  $4,3\%$  ( $2,8 - 6,1\%$ ) по сравнению со здоровыми людьми  $1,8\%$  ( $1,2 - 2,5\%$ )  $p=0,0018$  и больными ХОБЛ  $1,8$  ( $1,0 - 2,8\%$ )  $p=0,0042$ . Абсолютное количество эозинофилов у больных астмой было  $289$   $n/mm^3$  ( $185 - 414$   $n/mm^3$ ) что было больше чем у здоровых людей ( $116$   $n/mm^3$  ( $71 - 171$   $n/mm^3$ )  $p=0,011$ ). Активность глутатион- пероксидазы (GPx) в мокроте у больных ХОБЛ с не большим стажем курения было достоверно больше чем у здоровых людей ( $p=0,00002$ ) и у больных бронхиальной астмой ( $p=0,00005$ ), но, возрастая стажу курения, достоверно уменьшается ( $r^2=38,9\%$ ,  $r=-0,624$ ,  $p=0,0011$ ), что достоверно  $p=0,00069$ ,  $p=0,00073$  отличалось от здоровых людей и от больных бронхиальной астмой, у которых данные изменения не обнаруживались. На активность САТ в мокроте у больных ХОБЛ достоверно положительно влияло абсолютное число нейтрофильных лейкоцитов ( $r^2=34,3\%$ ,  $p=0,00038$ ), активность глутатион - пероксидазы ( $r^2=16,0\%$ ,  $p=0,0088$ ) и S ( $r^2=11,8\%$ ,  $p=0,021$ ) в мокроте. На активность САТ в мокроте у здоровых людей достоверно положительно влияло абсолютное число нейтрофильных лейкоцитов в мокроте ( $r^2=19,1\%$ ,  $p=0,0088$ ). На активность САТ в мокроте у больных бронхиальной астмой достоверно положительно влияло абсолютное число эозинофильных лейкоцитов в мокроте ( $r^2=21,4\%$ ,  $p=0,011$ ) и отрицательно - абсолютное число лимфоцитов в мокроте ( $r^2=14,3\%$ ,  $p=0,034$ ). Выявлено, что существует тенденция к увеличению окисляемость субстрата мокроты у больных ХОБЛ, по сравнению со здоровым людям  $p=0,054$ ,  $45,8$  у. е. ( $29,4 - 71,5$

у. е.) и 21,8 у. е. (13,7 – 34,9 у. е.). Активность глутатион - пероксидазы (GPx) в плазме достоверно не отличалось у представителей всех групп с не большим стажем курения, но возрастая стажу курения, достоверно увеличивался у больных ХОБЛ  $r^2=17,7\%$ ,  $r=0,421$ ,  $p=0,032$ . На активность глутамат-пероксидазы (GPx) в плазме у больных бронхиальной астмой достоверно положительно влияло абсолютное число моноцитов ( $r^2=16,5\%$ ,  $p=0,022$ ), и лимфоцитов ( $r^2=20,6\%$ ,  $p=0,011$ ) в крови, и отрицательно - взаимодействие этих факторов ( $r^2=16,1\%$ ,  $p=0,023$ ). Соотношение концентраций мочевины в мокроте и крови было больше у больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми людьми ( $p=0,069$ ) и больными бронхиальной астмой, однако со стажем курения это соотношение достоверно приросло как у больных ХОБЛ, так и у бессимптомных курящих  $r^2=30,6\%$ ,  $r=0,553$ ,  $p=0,0003$ . В случае низкой активности глутатион - пероксидазы (GPx) в мокроте соотношение мочевины мокрота / плазма у больных ХОБЛ была больше, чем у здоровых людей ( $p=0,00094$ ) и у больных бронхиальной астмой ( $p=0,015$ ), но, при возрастании активности глутамат-пероксидазы, соотношение мочевины мокрота / плазма у больных ХОБЛ понижалась  $r^2=29,9\%$ ,  $r=-0,547$ ,  $p=0,010$ . Концентрация  $\alpha_1$ -антитрипсина в плазме достоверно не отличалась у представителей всех групп, и, возрастая стажу курения, достоверно увеличивалась у здоровых людей и у больных ХОБЛ  $r^2=23,7\%$ ,  $r=0,487$ ,  $p=0,0047$ . У больных ХОБЛ, при увеличении числа нейтрофильных лейкоцитов в мокроте, достоверно увеличивалась концентрация  $\alpha_1$ -антитрипсина в плазме ( $r^2=38,2\%$ ,  $r=0,618$ ,  $p=0,024$ ). Изначально скорость выделения мокроты у больных ХОБЛ была достоверно больше, чем у здоровых людей и у больных бронхиальной астмой ( $p=0,010$ ,  $p=0,049$ ), но возрастая стажу курения, достоверно увеличивалась как у здоровых людей ( $r^2=19,4\%$ ,  $r=0,441$ ,  $p=0,017$ ) так и у больных бронхиальной астмой ( $r^2=28,1\%$ ,  $r=0,530$ ,  $p=0,00054$ ).

У больных ХОБЛ увеличено относительное и абсолютное число нейтрофильных лейкоцитов в мокроте и скорость выделения мокроты, что говорит об усиленном нейтрофильном воспалении и активности слизистых желез. Курение увеличивает относительное и абсолютное число нейтрофильных лейкоцитов в мокроте, относительное и абсолютное число палочко-ядерных лейкоцитов в крови и концентрацию  $\alpha_1$ -антитрипсина у представителей всех групп. Курение повышает относительное число эозинофильных лейкоцитов в



мокроте, а также относительную концентрацию мочевины у здоровых людей и больных ХОБЛ. У больных бронхиальной астмой увеличено относительное и абсолютное число эозинофильных лейкоцитов в мокроте, на что курение не влияет. Таким образом следует, что курение увеличивает нейтрофильное воспаление в дыхательных путях, лейкоцитоз в костном мозгу у представителей всех групп. Эозинофильное воспаление воздухоносных путей с сопровождающим увеличением проницаемости эпителия проявился только у здоровых людей и у больных ХОБЛ. У больных бронхиальной астмой курение не вызывая дальнейшего усиления эозинофильного воспаления. У некурящих и курящих больных ХОБЛ с небольшим стажем активность глутатион - пероксидазы (GPx) в мокроте повышена, а с возрастанием стажа курения, достоверно уменьшается. При возрастании стажа курения, активность глутамат-пероксидазы (GPx) в крови увеличивается. У больных ХОБЛ, при увеличении числа нейтрофильных лейкоцитов и окисляемости субстрата, повышается также активность САТ. Это указывает на активацию антиоксидативной системы глутатиона, которую подавляет вызванная курением дополнительная оксидативная нагрузка на дыхательные пути. При этом всеобщая антиоксидативная активность организма увеличивается.

## Ievads

Gan bronhiālā astma, gan hroniska obstruktīva plaušu slimība (HOPS) ir tipiskas plaušu iekaisumslimības [310]. Kaut arī abām slimībām raksturīgs gaisa plūsmas ierobežojums, tas HOPS gadījumā pārsvarā ir nereversīvs [296], turpretī astmas gadījumā- pārsvarā reversīvs spontāni vai bronhodilatatoru ietekmē [92]. HOPS gadījumā gaisa plūsmas ierobežojums var veidoties no trim komponentēm dažādās variācijās: iekšēja elpceļu iekaisuma hroniska bronhīta, bronhu spazmām un emfizēmas [84]. Bez tam HOPS slimniekiem ar nereversīvu gaisa plūsmas ierobežojumu var būt krietni palielināts eozinofilo leukocītu skaits un ECP koncentrācija ierosinātajās krēpās [310] un bronhu gļotādā [286, 382, 425] tāpat kā astmas slimniekiem. R. Luī pat iesaka no HOPS izdalīt atsevišķu fenotipu, ko nosauc par eozinofilo HOPS un kam raksturīgs tuklo šūnu un eozinofilo leukocītu iekaisums [310].

Vairumā astmas slimnieku ir nozīmīga apgriezeniska elpceļu konstrikcija un efektīva atbildreakcija uz inhalētu un sistēmisku pretiekaisuma terapiju. Turpretī mazāku daļu astmas slimnieku, kam attīstās minimāli apgriezenisks gaisa plūsmas ierobežojums, iespējams, var uzskatīt par HOPS slimniekiem [84]. Ir arī slimnieki, kam ir smēķēšanas izraisīts hronisks bronhīts ar nelielu fiksētu gaisa plūsmas ierobežojumu, bet kam rodas krietns akūts gaisa plūsmas ierobežojuma pieaugums akūta bronhīta laikā. Šiem cilvēkiem iespējama gan astma, gan HOPS [84]. Ilgstošas un smagas astmas gadījumā novērots arī izteikts neitrofīlo leukocītu iekaisums, jo stipri palielinās neitrofīlo leukocītu skaits ierosinātajās krēpās [248, 440], kas vairāk raksturīgs HOPS nekā bronhiālai astmai.

Kā redzams, abām šīm slimībām ir plašas pārklāšanās variācijas, kā arī bieži līdzīga patofizioloģija un ir daudz neskaidrību, tāpēc mēs savā pētījumā nolēmām iekļaut gan HOPS, gan astmas slimnieku grupas un gan nesmēķējošus, gan smēķējošus abu šo grupu slimniekus. Kontrolei, izvēlējamies veselus nesmēķētājus un smēķētājus bez elpceļu obstrukcijas ar dažādu smēķēšanas stāžu. Kā zināms, viens no galvenajiem HOPS veicinošiem faktoriem ir smēķēšana [296, 415], arī astmas saistība ar smēķēšanu ir samērā maz pētīta [27, 376, 463].

Tādām plaušu iekaisumslimībām kā HOPS un bronhiālā astma raksturīgs hronisks iekaisums un oksidantu un antioksidantu līdzsvara traucējums (oksidatīvs

stress), kas ir galvenais šūnu bojājumu cēlonis [409]. Galvenie oksidantu avoti ir šūnas: eozinofīlie leukocīti, neitrofilie leukocīti, makrofāgi, bronhu epitēlijšūnas u.c., kā arī tabakas dūmi un gaisa piesārņojums [64, 92, 296, 409, 415]. Attīstoties oksidatīvajam stresam, var sākties lipīdu peroksidācijas ķēdes reakcija, kuras gaitā tiek bojātas šūnu membrānas un ekstracelulārais matrikss, kā arī var izdalīties izoprostāni, piemēram, 8-izo-PGF<sub>2α</sub> [536], var aktivēties pret redukciju un oksidāciju jutīgi transkripcijas faktori- NF-κB, AP-1, kas savukārt regulē iekaisuma mediatoru, oksidantu un antioksidantu sintēzi [32, 33, 101, 409, 548]. Bez tam oksidanti var inaktivēt antiproteāzes, piemēram, α<sub>1</sub>-antitripsīnu, tāpēc var veidoties proteāžu un antiproteāžu līdzsvara traucējums [79, 235, 318]. Šo līdzsvara traucējumu var veidot vai nu palielināta proteīnāžu izdalīšanās un aktivitāte, vai mazināta antiproteīnāžu izdalīšanās un inaktivācija [296]. Šie novērojumi ir pamatā proteāžu un antiproteāžu līdzsvara trūkuma teorijai, kur līdzsvara trūkums starp proteīnāzēm un antiproteīnāzēm izraisa plaušu destrūkciju [296].

Pirmā un galvenā elpceļu epitēlija virsmas antioksidatīvās aizsardzības sistēma pret skābekļa un slāpekļa radikāļiem ir ekstracelulārā glutaciona peroksidāzes (eGPx)-glutaciona (GSH/GSSG) redukcijas un oksidācijas sistēma [101, 409]. Bez GPx arī katalāze (CAT) un superoksīda dismutāze (SOD) ir nozīmīgi antioksidatīvie enzīmi [415].

Pašreizējie pētījumu rezultāti par antioksidatīvās aizsardzības sistēmu ir pretrunīgi. Daļā pētījumu astmas un HOPS slimniekiem novērota vājināta [81, 144, 160, 210, 259, 278, 320, 360, 400, 406, 410, 433, 451], bet citos pastiprināta [101, 162, 327, 467, 468, 495, 502] antioksidatīvās sistēmas darbība. Pārsvārā pētījumu noteikta gan plaušu, gan asins intracelulārā antioksidatīvo enzīmu aktivitāte, bet mazāk ir pētījumu, kuros būtu noteikta ekstracelulārā šo enzīmu aktivitāte. Lai vērtētu intralumināro iekaisumu un antioksidatīvo enzīmu aktivitāti elpceļos, mēs izvēlējāmies nesen izstrādāto ierosināto krēpu metodi, kas vairāk atspoguļo tieši intralumināro iekaisumu [204]. Mēs vēlējamies noteikt enzimatisko antioksidantu (GPx un CAT) aktivitāti krēpu supernatantā un plazmā, bet nenoteicām neenzimatisko antioksidantu (C, E vitamīnu, flavīnus u.c.) koncentrāciju. C un E vitamīna, flavīnu antioksidatīvās īpašības ir diskutējamas. Tie var darboties gan par antioksidantiem [64, 108], gan par prooksidantiem atkarībā no vides īpašībām [64]. Piemēram, E, C vitamīns, flavīni Fe<sup>2+</sup> jonus var reducēt par Fe<sup>3+</sup> joniem, kas iesaistoties Fentona un

Herbera- Veisa reakcijā, der par katalizatoru oksidantu veidošanā un lipīdu peroksidācijā, veidojot efektīvu oksidācijas ciklu [64]. Kā zināms dzelzs palielinātā daudzumā sastopama tabakas dūmos [415], smēķētāju alveolārajos makrofāgos un BAL supernatantā [498, 534], kā arī uzkrājas mūža laikā [102].

Atšķirībā no bronhu biopsijas, bronhu skalojuma (BW) un bronhoalveolārās lavāžas (BAL), ko iegūst bronhoskopijas laikā, krēpu ierosināšana ir vienkārša, neinvazīva, viegli paciešama, ne pārāk dārga procedūra bez nozīmīgām blaknēm bronhu iekaisuma vērtēšanai astmas un HOPS slimniekiem [204, 266, 316, 387]. Krēpu ierosināšana ar hipertonusu sāls šķīdumu atzīta par drošu metodi gan veseliem cilvēkiem, gan astmas, gan HOPS slimniekiem, ja pirms sāls šķīduma inhalācijas tiek lietoti inhalējamie  $\beta_2$  agonisti [205, 387].

Ierosināto krēpu metode ir precīza elpceļu iekaisuma vērtēšanas metode ar augstu šūnu diferenciālās skaitīšanas atkārtojamību starp pētniekiem, atkārtotu krēpu ierosināšanu ar vairāku dienu starplaiku un atsevišķiem krēpu paraugiem tādām šūnām kā eozinofilie un neitrofilie leukocīti, makrofāgi, kā arī ar augstu bioķīmisko analīžu rezultātu atkārtojamību krēpu supernatantā [239, 387, 390, 469, 528]. Bet šai metodei ir zema absolūtā šūnu skaita, limfocītu un vidēja epitēlijšūnu diferenciālā skaita atkārtojamība [387, 390, 469, 528]. Bez tam atšķirībā no BAL un BW metodes izmantojot ierosināto krēpu metodi, iegūst daudz mazāk atšķaidītu supernatantu bioķīmiskām analīzēm. Palielināts plakanā epitēlija šūnu relatīvais skaits, kas norāda uz siekalu piejaukumu, mazina šūnu skaitīšanas atkārtojamību [391, 528]. Lai izvairītos no palielināta siekalu piejaukuma negatīvās ietekmes uz šūnu skaitīšanas rezultātiem un krēpu supernatantā nosakāmo enzīmu atšķaidīšanās, mēs, tāpat kā to iesaka R. Vards un E. Picikīni, paraugus, kuros bija vairāk par 30% plakanā epitēlija, izslēdzām no pētījuma [391, 528].

Tā kā krēpu ierosināšana ir samērā jauna metode, ir maz datu par antioksidatīvās aizsardzības sistēmas aktivitāti krēpu supernatantā astmas un HOPS slimniekiem un smēķēšanas ietekmi uz šo aktivitāti. Arī šūnu skaitīšanas dati ierosinātās krēpās bieži ir pretrunīgi. Maz pētītas arī eozinofilā HOPS un smēķējošu astmas slimnieku ierosināto krēpu šūnu un oksidatīvā stresa saistība. Tāpēc mēs veicām krēpu ierosināšanu gan smēķētājiem ar dažādu smēķēšanas stāžu, gan nesmēķējošiem HOPS un astmas slimniekiem, veseliem nesmēķētājiem, smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas un noteicām krēpu šūnu diferenciālo un absolūto skaitu, asins šūnu skaitu, kopējo substrāta oksidējamību krēpu supernatantā un plazmā, GPx un

katalāzes aktivitāti krēpu supernatantā un plazmā, kā arī ārējās elpošanas raksturlielumus veicot bronhodilatācijas un bronhoprovokācijas testus.

## Literatūras apskats

### 1. Obstruktīvās plaušu iekaisumslimības

Difūzās plaušu slimības tiek iedalītas divās kategorijās: 1) *obstruktīvajās slimībās*, kam raksturīgs gaisa pretestības pieaugums sakarā ar elpceļu obstrukciju jebkurā līmenī, sākot no trahejas un lielajiem bronhiem līdz terminālajiem bronhiem un respiratorajām bronhiolām; un 2) *restriktīvajās slimībās*, kam raksturīga ierobežota plaušu parenhīmas elastība, kas mazina plaušu kopējo tilpumu. Lai gan iespējams arī obstruktīvās un restriktīvās komponentes sajaukums [274].

Biežāk sastopamās plaušu *obstruktīvās slimības* ir *emfizēma*, *hronisks bronhīts*, *bronhiālā astma*, *hroniska obstruktīva plaušu slimībai (HOPS)* un *bronhektāzes*. Šiem slimniekiem, vērtējot ārējās elpošanas funkciju, konstatē paaugstinātu pretestību elpceļos un ierobežotu maksimālās izelpas gaisa plūsmas ātrumu forsētas izelpas laikā [274].

*Hroniska obstruktīva plaušu slimība* (latviski **HOPS**, angļiski **COPD**) ir slimība, kam raksturīgs gaisa plūsmas ierobežojums, un daļējs apgriezeniskums. Gaisa plūsmas ierobežojums parasti ir progresējošs un saistīts ar plaušu nenormālu iekaisumatbildi uz kaitīgu daļiņu vai gāzu iedarbību [296].

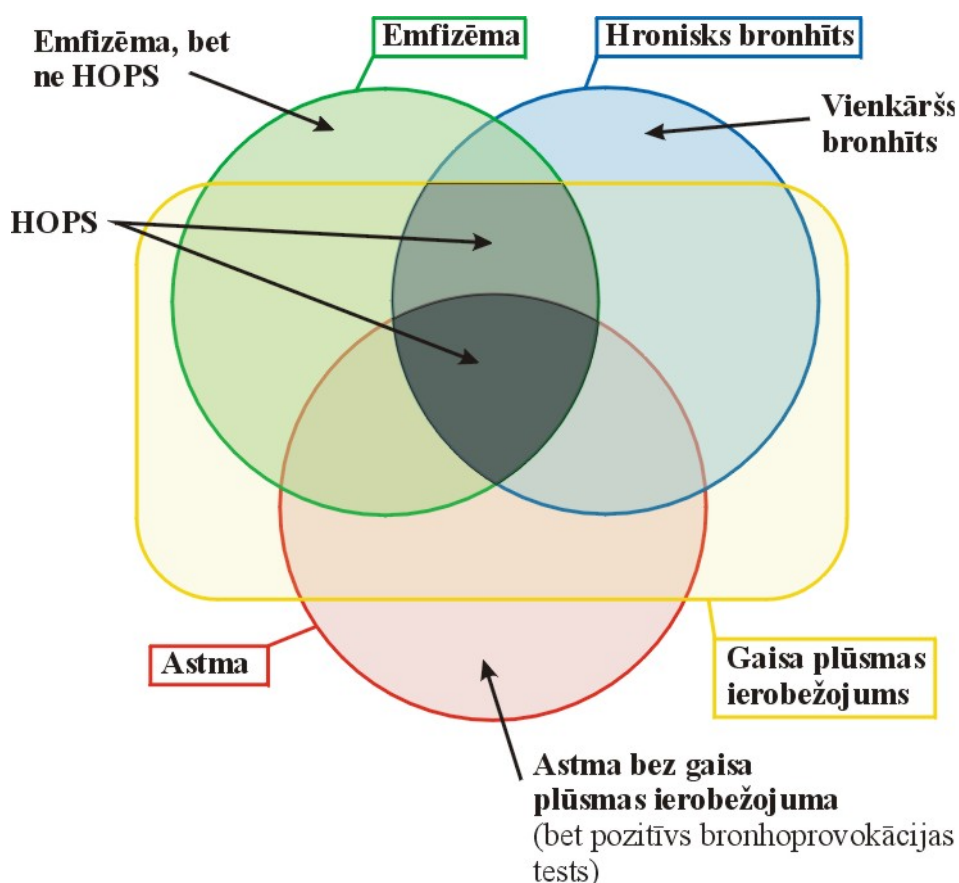
Hronisku gaisa plūsmas ierobežojumu, kas raksturīgs HOPS, izraisa **mazo elpceļu slimība (obstruktīvs bronhiolīts)** un **plaušu parenhīmas destrukcija (emfizēma)**, kuru relatīvā attiecība variē starp HOPS slimniekiem [296]. Hronisks iekaisums izraisa mazo elpceļu remodelāciju un sašaurināšanos. Plaušu parenhīmas destrukcija iekaisuma dēļ rada alveolu un mazo elpceļu piestiprinājuma zaudējumu, tāpēc mazinās plaušu elastības spēks un samazinās šo elpceļu spēja palikt atvērtiem izelpas laikā [296]. Bez tam pārsvarā gadījumu vērojama arī gļotu hipersekrecija (hronisks bronhīts) kuras cēlonis ir bronhu gļotu dziedzeru hiperplāzija zemgļotādā un kausšūnu skaita palielināšanās bronhu epitēlijā [29].

**HOPS** raksturīgo gaisa plūsmas ierobežojumu nosaka trīs komponentes dažādās variācijās: *iekšējas elpceļu iekaisumslimības (hronisks bronhīts un bronhiolīts)*, *bronhu spazmas* un *emfizēma*. Gaisa plūsmas ierobežojums pārsvarā ir progresējošs un var būt saistīts ar elpceļu hiperreaktivitāti [1, 459]. 1. attēlā redzama HOPS komponentu savstarpējā saistība un dažādas pārklāšanās variācijas [84].

**Hronisks bronhīts** ir klīnisks termins, kam raksturīgs klepus un krēpu izdalīšanās pārsvarā dienu vismaz trīs mēnešus gadā un divus gadus pēc kārtas. Hroniska bronhīta gadījumā raksturīga bronhu gļotādas un zemgļotādas tūska un iekaisums ar zemgļotādas gļotu dziedzeru skaita un izmēra palielināšanos, tādēļ sabiezinās bronhu sienīņa [84].

Svarīgi uzsvērt, ka daudziem slimniekiem, kam ir tikai hronisks bronhīts, bet nav gaisa plūsmas ierobežojuma simptomu, nevar klasificēt par HOPS slimniekiem [84].

**Emfizēma** tiek patoloģiski definēta par neatgriezenisku elpceļu paplašināšanos distāli no terminālās bronheolas un ietver alveolāro septu destrukciju. Emfizēmai raksturīga plaušu parenhīmas destrukcija, tādēļ mazinās parenhīmas piesaiste pie elpceļiem, plaušu elastība un plaušu parenhīmas spēja izplest elpceļus [84].



**1. attēls. Hroniskas obstruktīvas plaušu slimības (HOPS) komponentes.** Katrs aplis raksturo nozoloģisku vienību. Taisnstūris raksturo gaisa plūsmas ierobežojumu, kas noteikts spirometriski kā  $FEV_1$ . Ēnotais apgabals raksturo HOPS diagnozi [84].

Vairumam HOPS slimnieku ir hroniska bronhīta un emfizēmas kombinācija ar gaisa plūsmas ierobežojumu. Bet daudziem cilvēkiem var būt hronisks bronhīts bez

gaisa plūsmas ierobežojuma, kas nav saistīts ar HOPS un astmu [84]. Var būt arī emfizēma, bet nebūt gaisa plūsmas ierobežojuma un HOPS, piemēram: ir bullas krūškurvja radiogrāfijā, bet nav gaisa plūsmas ierobežojuma. Bez tam var būt HOPS slimnieki ar nereversīvu gaisa plūsmas ierobežojumu, bet stipri palielinātu eozinofilo leukocītu skaitu un ECP (eozinofilo leukocītu katjoniskais proteīns) koncentrāciju ierosinātajās krēpās [310] un bronhu gļotādā [286, 382, 425] tāpat kā astmas slimniekiem. R. Luī pat iesaka no HOPS izdalīt atsevišķu fenotipu, ko nosauc par eozinofilo HOPS un kam raksturīgs tuklo šūnu un eozinofilo leukocītu iekaisums [310].

***Bronhiālā astma ir hroniska elpceļu iekaisumslimība, kurā iesaistītas daudzas šūnas un to elementi. Hronisks iekaisums palielina elpceļu hiperreaktivitāti, kas izraisa atkārtotu sēkšanu, elpas trūkumu, smaguma sajūtu krūtīs un klepu, īpaši naktī vai agri no rīta. Šīs epizodes parasti saistītas ar mainīgu gaisa plūsmas obstrukciju, kas parasti pāriet spontāni vai pēc ārstēšanās [92].***

Astma ir elpceļu iekaisumslimība, kam raksturīga apgriezenisks gaisa plūsmas ierobežojums [84]. Vairumam astmas slimnieku ir nozīmīga apgriezeniska elpceļu konstrikcija un efektīva atbildreakcija uz inhalētu un sistēmisku pretiekaisuma terapiju. Turpretī mazāku daļu astmas slimnieku, kam attīstās minimāli apgriezenisks gaisa plūsmas ierobežojums, iespējams, var uzskatīt par HOPS slimniekiem [84]. Var būt arī astmas slimnieki bez gaisa plūsmas ierobežojuma, bet viņiem astmu diagnosticē tikai pēc pozitīva bronhoprovokācijas testa [84]. Ir arī slimnieki, kam ir smēķēšanas izraisīts hronisks bronhīts ar zināmas pakāpes fiksētu gaisa plūsmas ierobežojumu un kam attīstās jūtams akūts gaisa plūsmas ierobežojuma pieaugums akūta bronhīta epizodes laikā. Šos cilvēkus klasificē par astmatiska bronhīta slimniekiem uzskatot, ka viņiem ir gan astma, gan HOPS [84]. Ilgstošas un smagas astmas gadījumā novērots arī izteikts neitrofilo leukocītu iekaisums, jo ievērojami palielinās neitrofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās [248, 440], kas vairāk raksturīgs HOPS nekā astmai.

### **Riska faktori**

Pašlaik, **HOPS riska faktori** tiek iedalīti divās daļās: *saimniekfaktori* un „*ārējie faktori*”, kuru mijiedarbības gaitā attīstās šī slimība [296]. Par galveno saimniekfaktoru tiek minēts  $\alpha_1$ -antitripsīna deficīts [296]. Par galveniem ārējiem faktoriem tiek minēti tabakas dūmi, arodputekļi un ķīmikālijas (tvaiki, kairinošas vielas, dūmi), iekštelpu un āra gaisa piesārņojums [296].



**Saimniekfaktori.** Domājams, ka dažādi *ģenētiski faktori* paaugstina vai mazina HOPS risku. Iepriekšējos pētījumos noskaidrots, ka paaugstināts HOPS risks ir cilvēkiem, kuru ģimenē bijusi HOPS anamnēze [296]. Tas daļēji var būt saistīts ar vides un daļēji ar ģenētiskiem faktoriem [86, 462]. Visvairāk aprakstītais riska faktors ir iedzimts  $\alpha_1$ -antitripsīna deficīts jo  $\alpha_1$ -antitripsīns ir galvenais cirkulējošais serīna proteīnāžu inhibitors. Šī retā iedzimtā recesīvā pazīme visbiežāk sastopama Ziemeļeiropā [296]. Smagāka  $\alpha_1$ -antitripsīna deficīta gadījumā notiek strauja pāragra panlobulāras emfizēmas attīstība un plaušu funkcijas mazināšanās, kas vērojama, gan smēķētājiem, gan nesmēķētājiem, tomēr smēķēšana šo risku būtiski palielina. Kaut arī  $\alpha_1$ -antitripsīna deficīts ir tikai nelielai daļai pasules iedzīvotāju, tas parāda iedzimtības un apkārtējās vides faktoru mijiedarbības modeli, kas var izraisīt HOPS [296].

Ir atklāti daudzi gēni, kas, iespējams, var ietekmēt risku saslimt ar HOPS. Pie tādām pieder A asins grupas antigēna sekretorais statuss [96, 269], mikrosomu epoksīda hidrolāze [465], glutaciona S-transferāze [214],  $\alpha_1$ -antihemotripsīns [155], komplementa GcG komponente [444], citokīnu TNF- $\alpha$  [234] un mikrosatelītu nestabilitāte [460]. Daudzi no šiem gēniem ir saistīti ar iekaisumu un tāpēc iesaistīti HOPS patoģenēzē [296].

**Ārējie faktori.** Runājot par ārējo faktoru ietekmi, gribas domāt par ieelpoto daļiņu kopējo slodzi [296]. Katrs daļiņu tips atkarībā no to lieluma un sastāva var dot dažādu ieguldījumu kopējā HOPS riskā, kas atkarīgs no inhalēto vielu ietekmes kopuma (summas). No daudzām ieelpotajām vielām, ar ko cilvēks var sastapties savā mūžā, tikai tabakas dūmi [66, 220, 455], arodputekļi un ķīmikālijas (tvaiki, ķīmiski kairinātāji un dūmi) [39] vieni paši var izraisīt HOPS. Tabakas dūmi un arodpiesārņojums arī var būt HOPS papildrisks [296].

**Tabakas dūmi** ir nozīmīgākais HOPS riska faktors ar straujāko FEV<sub>1</sub> krišanās ātrumu un lielāko mirstību smēķējošiem nekā nesmēķējošiem HOPS slimniekiem [296]. Atšķirība starp smēķētājiem un nesmēķētājiem pieaug tieši proporcionāli smēķēšanas daudzumam [296]. Smēķēt sākšanas vecums, kopējie nosmēķētie pakgadi un pašreizējais smēķēšanas statuss ir prognozējoši mirstībai no HOPS [296]. Ne visiem smēķētājiem attīstās klīniski nozīmīgs HOPS, kas liecina, ka ģenētiski faktori var modificēt individuālo HOPS risku. Kaut arī vēl nav skaidrs, kādai smēķētāju daļai attīstās šī slimība, pašreizējos ziņojumos figurē aptuveni 15-20% smēķētāju, kas acīmredzot ir mazāks par reālo skaitu, jo HOPS bieži ir nepietiekami diagnosticēta un novērtēta [296].

Pasīvā smēķēšana (tabakas dūmu klātie gaisā) arī var veicināt respiratoru simptomu un HOPS attīstību, palielinot kopējo ieelpoto daļiņu un gāzu slodzi plaušām [117, 298]. Smēķēšana grūtniecības laikā var palielināt embrija plaušu augšanas traucējumu un imūnsistēmas aktivācijas risku [481].

**Aroputekļi un ķīmikālijas** (tvaiki, kairinošas vielas un dūmi) arī var izraisīt HOPS, īpaši ja to iedarbība ir ilgstoša un intensīva. Šis piesārņojums var izraisīt HOPS neatkarīgi no tabakas dūmu klātbūtnes [296]. Ieelpotas cietas vielas daļiņas, kairinošas vielas, putekļi un sensitizējošas vielas var palielināt elpceļu reaktivitāti, īpaši ja tie ir bojāti ar tabakas dūmiem, citām vielām, vai astmu [296].

**Āra gaisa piesārņojuma** nozīme HOPS attīstībā ir neskaidra, bet tā ir neliela, salīdzinot ar smēķēšanu [296]. Nav arī skaidrs, kuras kopējā gaisa piesārņojuma sastāvdaļas ir kaitīgas un var palielināt kopējo ieelpoto kaitīgo vielu slodzi plaušām [296]. Par HOPS riska faktoru tiek minēts arī iekštelpu gaisa piesārņojums, kas veidojas, lietojot biomasas kurināmo cepot un apsildot telpas sliktas ventilācijas gadījumā. Tāpēc iekštelpas gaisā rodas daudz cietu daļiņu [9, 40, 125, 379, 439, 486].

**Bronhiālās astmas riska faktori** tiek iedalīti *saimniekfaktoros*, kas predisponē vai aizsargā pret astmas attīstību, un *vides faktoros*, kas ietekmē predisponētu indivīdu uzņēmību pret astmu, izraisa paasinājumus un simptomus [92]. Par nozīmīgākajiem astmas riska faktoriem tiek uzskatīti astma ģimenes anamnēzē, pozitīva ādas raudze pret aeroalergēniem, atkārtots bronhīts pirmo divu mūža gadu laikā. Savukārt bronhu hiperreaktivitātes riska faktori ir atkārtots bronhīts pirmo divu mūža gadu laikā, atopisks dermatīts, sensibilizācija pret aeroalergēniem [372]. Par nozīmīgu astmas riska faktoru uzskatāms arī pastāvīgs rinīts gan atopiskiem, gan neatopiskiem indivīdiem. Bronhu hiperreaktivitāte cilvēkiem ar rinītu un bez astmas klīniskām izpausmēm sastopama daudz biežāk nekā veseliem nesmēķētājiem [150, 299].

Pie *saimniekfaktoriem* pieder ģenētiska predispozīcija, elpceļu hiperreaktivitāte, dzimums, vecums un rase [92].

Pie *vides faktoriem* pieder aeroalergēni, arodalergēni, tabakas dūmi, gaisa piesārņojums, bakteriālās un vīrusu infekcijas, uzturs un pacientu sociālekonomiskais stāvoklis [92].

**Tabakas dūmi.** Lai gan nav pierādīts, ka smēķēšana pieaugušiem palielinātu astmas risku, tomēr tā paātrina plaušu funkcijas mazināšanos, nosaka smagāku astmas gaitu [463], mazina ārstēšanas efektivitāti [376] un palielina arodastmas iespējamību

[27]. Aktīva smēķēšana var palielināt astmas risku strādniekiem, kas ikdienā saskaras ar arodsensitivizējošām un kairinošām vielām [27]. Tomēr astmas saistība ar smēķēšanu vēl ir samērā neskaidra. Uzskata, ka smēķēšana var padarīt smagāku astmas gaitu, bet nav pierādījumu, ka tā varētu izraisīt astmu [463].

Pasīva smēķēšana (tabakas dūmu klātie gaisā) arī var pasliktināt astmas simptomus un palielināt bronhu reaktivitāti [245]. Smēķēšana grūtniecības laikā vai pasīva smēķēšana pēc bērna piedzimšanas palielina astmas un dziļo elpceļu infekcijas risku bērnībā [148, 161, 531]. Pasīvās smēķēšanas ietekme uz pieaugušiem pagaidām vēl ir neskaidra [92].

**Arodputekļi un ķīmikālijas.** Astmas paasinājumu un, iespējams, arī rašanos var provocēt virkne neorganisku un organisku vielu, ar ko cilvēks sastopas darbā [92]. Ieelpotas cietas vielas daļiņas, kairinošas vielas, putekļi un sensitivizējošas vielas var palielināt elpceļu reaktivitāti, īpaši kombinācijā ar tabakas dūmiem [92, 296]. Aptuveni 5% strādnieku, kas iepriekš nav slimojoši ar astmu, bet strādā rūpnīcās, kur ik dienu saskaras ar toluidīna diizocianātu, attīstās astma [132].

**Āra un iekštelpu gaisa piesārņojums.** Pierādīts, ka gaisa piesārņojums var izraisīt astmas paasinājumu [275]. Novērota būtiska korelācija starp tādu gaisa piesārņojumu kā ozonu, slāpekļa oksīdiem, skābju aerosoliem un cietām daļiņām ar astmas simptomiem un paasinājumiem [92]. Āra gaisa piesārņojuma nozīme astmas attīstībā vēl ir neskaidra. Gaisa piesārņojums ar ozonu, slāpekļa oksīdiem un skābju aerosoliem, iespējams, var kļūt par astmas palaidējfaktoru, lai gan līdz šim veiktie pētījumi vēl neļauj to pilnībā apstiprināt [141, 519]. Viens no astmu veicinošiem mehānismiem var būt ziedputekšņu alergēna piesaistīšanās uz dīzeļmotoru izplūdes gāzu daļiņu virsmas, tādējādi piesārņojuma daļiņām kļūstot par dabisko alergēnu nesējiem, kas veicina to deponēšanu plaušās [131, 273, 354, 438].

Arī iekštelpu gaisa piesārņojums, iespējams, var būt astmas riska faktors, lai gan tas vēl nav droši pierādīts [92]. Galvenais iekštelpu gaisa piesārņojums ir NO, NO<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>CO, izocianāts un bioloģiskais piesārņojums [439] [92]. Iekštelpu gaisa piesārņojums veidojas, lietojot biomasas kurināmo: malku, ogles, petroleju un cepot sliktas ventilācijas apstākļos [92]. Iekštelpu gaisa piesārņojums var veidoties arī no gaistošām vielām, piemēram, formaldehīda, kas izdalās no dažādiem ķīmiskiem produktiem, ko izmanto māju siltināšanā vai mājturības priekšmetu ražošanā, kā arī krāsām, lakām, līmēm u.c. [92].

## **1.1. Bronhiālā astma: iekaisumšūnas, to aktivācijas un mijiedarbības mehānismi**

### **1.1.1. Akūts alergisks iekaisums**

#### **1.1.1.1. Agrīnās fāzes reakcija**

Alerģiska iekaisuma agrīnās fāzes reakcija notiek pēc tam, kad iepriekš sensitivizēts alergisks slimnieks ieelpo alergēnu. Agrīnās fāzes reakcija var sākties, kad alergēns šķērssaistījies ar alergēnspecifisko IgE, kas atrodas uz šūnu virsmas. Uzskatīta, ka šai procesā galvenā nozīme ir tuklām šūnām, bazofiliem leukocītiem [165, 307] un makrofāgiem [50, 72], uz kuru virsmas atrasti gan augstas afinitātes FcεRI receptori IgE piesaistīšanai [237], gan arī zemas afinitātes FcεRII (CD23) IgE receptori makrofāgiem [535].

Bez tam tuklo šūnu aktivācija var notikt ne tikai IgE un antigēna saistīšanās gaitā, bet arī neimunoloģiski - osmolaritātes pārmaiņu dēļ, ķīmisku, hipoksijas u.c. faktoru ietekmē. Piemēram, osmolaritātes palielināšanās dehidratācijas un hiperventilācijas dēļ (tāpat kā hipertona sāls šķīduma inhalācija) var būt tuklo šūnu aktivācijas un slodzes astmas lēkmes izraisītāja, tāpat osmolaritātes mazināšanās miglainā laikā (tāpat kā hipotona šķīduma inhalācija) var būt astmas lēkmes cēlonis [41]. Arī NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, kas veido gaisa piesārņojumu pilsētā var izraisīt tuklo šūnu aktivāciju [163, 345]. Tuklo šūnu aktivāciju var izraisīt arī hipoksija [4] un baktēriju izdalīti produkti [359].

Ar alergēnu aktivētie alveolārie **makrofāgi** [72, 73, 257, 331, 500] var iesaistīties iekaisuma attīstībā un elpceļu obstrukcijā, izdalot enzīmus [257], eikosanoīdus piemēram LTB<sub>4</sub> [114], PAF [16], brīvos skābekļa radikāļus [72] un citokīnus IL-1, IL-6, u.c. [51, 85]. Bez tam alveolārie makrofāgi var regulēt arī imūno atbildi [18, 399].

#### **1.1.1.1.1. Tuklo šūnu un bazofilo leukocītu izdalītie iekaisuma mediatori**

Aktivētas **tuklās šūnas** un **bazofilei leukocīti** degranulējas un izdala gan primāros (iepriekš sintezētus), gan sekundāros iekaisuma mediatorus (sintezētus pēc aktivācijas) [50, 247, 533].

#### 1.1.1.1.1.1. Primārie mediatori

**Primārie mediatori** ir biogēniskie amīdi - histamīns un adenozīns, proteoglikāni, heparīns, kā arī neitrofilo un eozinofilo leukocītu hemotakses faktori [50, 197].

**Histamīns.** Histamīna palielināta koncentrācija BAL novērota jau 5 min pēc provokācijas ar antigēnu [247, 307]. Histamīns, iedarbojoties uz H<sub>1</sub> receptoriem, ir spēcīgs bronhu gludās muskulatūras kontrakcijas izraisītājs [164], kā arī elpceļu mikroasinsvadu caurlaidības palielinātājs [201] un vazokonstriktors pulmonāros asinsvados [506]. H<sub>2</sub> receptoru aktivācija veicina gļotu sekrēciju un vazodilatāciju sistēmiskos asinsvados arī elpceļu mikroasinsvados [506], kā arī, iespējams, aktivē alveolāros makrofāģus, iedarbojoties uz to H<sub>2</sub> receptoriem [358]. Bez tam histamīns, iedarbojoties lokāli uz nemielenizētām sensoriskajām C nervšķiedrām, ierosina aksonrefleksu pēc kura no šo nervšķiedru atzarojumiem izdalās neuropeptīdi- SP, NKA, NKB, CGRP, kas izraisa brohokonstrikciju [274], postkapilāro vēnulu vazodilatāciju un caurlaidības pieaugumu [30, 45].

**Adenozīns** izraisa bronhokonstrikciju un tuklo šūnu aktivitātes pastiprināšanos [226].

**Heparīns.** Bez plaši zināmās heparīna antikoagulatīvās darbības tam var būt arī iekaisuma modulēšanas [197, 508], audu homeostāzes modulēšanas, šūnu diferenciācijas un proliferācijas modulēšanas īpašības [254]. Heparīns inhibē agrīnās fāzes reakciju alerģiskiem slimniekiem [55, 130].

**Neitrofilo un eozinofilo leukocītu hemotakses faktori** veicina neitrofilo un eozinofilo leukocītu hemotaksi un infiltrāciju bronhos [50].

#### 1.1.1.1.1.2. Sekundārie mediatori

**Sekundārie mediatori** ir leukotriēni- LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, D<sub>2</sub> prostaglandīns, trombocītu aktivācijas faktors (PAF) un citokīni - IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL13, GM-CSF, TNF-α [175].

**Leikotriēni LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>,** ir vieni no spēcīgākajiem bronhokonstriktoriem, īpaši LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, [28, 112, 116, 203, 529]. Leikotriēni LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> palielina asinsvadu caurlaidību tāpēc attīstās gļotādas tūska [97, 113, 256] un veicina gļotu dziedzeru darbību izraisot gļotu hipersekrēciju [253, 322].

**Leikotriēns LTB<sub>4</sub>** ir spēcīgs hemotakses un aktivācijas faktors neitrofilajiem, eozinofilajiem leukocītiem un monocītiem [166, 329, 349].

**Prostaglandīns PGD<sub>2</sub>** ir spēcīgs elpceļu gludās muskulatūras kontrahētājs, ievadīts artērijā tas ir spēcīgs suņa trahejas asinsvadu dilatators [288] un gļotu hipersekrecijas izraisītājs [105].

**PAF** ir spēcīgs bronhokonstriktors. PAF izraisa citu iekaisuma mediatoru- prostaglandīnu, leukotriēnu un skābekļa radikāļu- izdalīšanos no citām šūnām, piemēram, trombocītiem, neitrofilajiem leukocītiem u.c. PAF regulē adhēzijas molekulu ekspresiju uz neitrofiliem un eozinofiliem leukocītiem un ir to hemotaksīns [353], kā arī izraisa trombocītu agregāciju [31].

**Citokīniem IL-4 un IL-13** ir būtiska nozīme B limfocītu diferenciācijā un ieslēgšanā uz IgE producēšanu. IL-4 ir būtiska nozīme arī Th<sub>2</sub> limfocītu diferenciācijā [215].

**IL-5 un GM-CSF** ir nozīme eozinofilo leukocītu saistīšanā elpceļu sienā un aktivācijā [308, 347, 478], kā arī adhēzijas molekulu ekspresijā [353, 448].

**IL-3** ir būtisks citokīns eozinofilo leukocītu piesaistīšanai elpceļos [17].

**TNF- $\alpha$**  arī, iespējams, ir būtisks citokīns neitrofilo un eozinofilo leukocītu piesaistīšanai [193, 215].

**Proteāzes- triptāze, hemāze** [282]. Triptāze palielina elpceļu mikroasinsvadu caurlaidību [198, 215] un veicina histamīna izraisītu bronhokonstrikciju [255]. Triptāze ir mitogēniska epitēlijšūnām, izraisa IL-8 sintēzi un ICAM-1 ekspresiju, veicinot epitēlija reparāciju un granulocītu piesaistīšanu elpceļos [70]. Himāzei ir prokolagēna kolagenāzes īpašības- tā pārveido prokolagēnu par šķiedru veidojošu kolagēnu [276] palielinot krēpu viskozitāti.

Vispirms primāro mediatoru (histamīna, adenozīna, kā arī pēc histamīna mediētās neironālās atbildes) ietekmē īsu brīdi pēc alergēna inhalācijas sākas bronhokonstrikcija, bronhu vazodilatācija, palielinās asinsvadu sienas caurlaidība, izraisot bronhu gļotādas tūsku, plazmas eksudācija bronhos [200, 201, 513], kā arī gļotu hipersekrecija [215]. Pēc tam šo procesu turpina pastiprināt arī sekundārie mediatori LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub>, PAF [274]. Tāpēc agrīnās fāzes reakcija, ko labi raksturo FEV<sub>1</sub> mazināšanās, ilgst aptuveni 0,5-2 h pēc alergēna inhalācijas [17]. Bez tam tuklo šūnu un makrofāgu izdalīto LTB<sub>4</sub>, PAF un citokīnu ietekmē sākas limfocītu un iekaisumšūnu diferenciācija, aktivācija, adhēzija un migrācija bronhu sienā [215], kas 50-60% indivīdu izraisa vēlīnās fāzes reakciju [17].

### 1.1.1.2. Vēlīnās fāzes reakcija

Vēlīnās fāzes iekaisumreakcija notiek 6-9 h pēc alergēna provokācijas [120] un var ilgt 12-24 h [274]. Šai procesā tiek piesaistīti un aktivēti eozinofīlie leukocīti [120, 157, 247, 307, 338], CD4+ T limfocīti [307, 418], bazofīlie leukocīti [207, 307, 338], neitrofilie leukocīti [157, 277, 307, 338, 355] un makrofāgi [73]. Lai gan neitrofilo leukocītu skaita palielināšanās nav antigēn- specifiska, jo līdzīga atbilde novērota uz nespecifisku stimulu [307], tomēr konstatēta arī pastiprināta neitrofilo leukocītu aktivitāte astmas slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [158]. Kaut arī tuklo šūnu primāro mediatoru izdalīšana, iespējams, ir sākummehānisms agrīnai šūnu piesaistīšanai [56, 358], tas paplašinās, iesaistot arvien vairāk T limfocītu, par ko liecina 24 h pēc alergēna iedarbības palielinātais aktivētu IL-2+ T limfocītu skaits un IL-5, GM-CSF mRNS ekspresijas pieaugums bronhu biopsijās [44]. Bez tam limfocītiem no akūtas astmas slimnieku ierosinātām krēpām ir vājināta apoptoze, kas ļauj tiem ilgāk izdzīvot elpceļos, uzkrājoties lielākā skaitā un paplašināt iekaisumu [211]. IL-5, GM-CSF ir būtiska nozīme eozinofīlo leukocītu aktivēšanā un saistīšanā elpceļos, kā arī to nobriešanā [238, 308, 363, 418] un adhēzijas molekulu ekspresijā [353, 448]. Būtiska nozīme iekaisumšūnu piesaistīšanā ir adhēzijas molekulām CD11a, CD11b, VLA-4, ICAM-1 un VCAM-1 [49, 179, 195], un, tā kā VLA-4 nav sastopams neitrofīliem leukocītiem, to var skaidrot ar eozinofīlo leukocītu selektīvo piesaistīšanu astmas gadījumā [353, 362]. Arī tādi hemotaksīni kā RANTES un eotaksīns palielina eozinofīlo leukocītu [7, 151, 176, 238, 493] un T limfocītu piesaistīšanu elpceļos [7, 436]. Hemotakses faktori IL-16, un MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 arī iatrsti ar antigēnu provocētu astmas slimnieku BAL šķidrumā, un, iespējams, tiem ir nozīme šūnu migrācijas regulācijā [109, 225].

Aktivēto eozinofīlo leukocītu izdalītie toksiskie proteīni ECP, MBP, END un brīvie skābekļa radikāļi, iespējams, bojā bronhu epitēliju [190]. Bez tam eozinofīlie leukocīti izdala leukotriēnus un prostaglandīnus [68], augšanas faktoros [190, 525, 526, 532], citokīnus IL-4, IL-5 [63, 544]. Eozinofīlo leukocītu un citu iekaisumšūnu izdalītie mediatori kontrahē bronhu gludu muskulatūru [403], palielina bronhu asinsvadu sienas caurlaidību [98] un elpceļu reaktivitāti pret specifiskiem un nespecifiskiem mediatoriem [293].

### 1.1.2. Hronisks alerģisks iekaisums

Hronisks iekaisums sastopams alerģiskas [236, 238], nealerģiskas [43, 236, 238], arodierosinātas [154], un aspirīnierosinātas astmas gadījumā [352, 464]. Elpceļu hroniska iekaisuma cēlonis astmas gadījumā vēl ir neskaidri. Uzskata, ka ilgstoša vai bieža elpceļu ekspozīcija ar alerģēnu [135], ķīmiskiem ierosinātājiem [52, 344], piesārņojumu [126, 270, 280, 281] vai vīrusinfekciju [67, 74, 168] izraisa hronisku iekaisumu, kam raksturīga nespecifiska elpceļu hiperreaktivitāte, elpceļu epitēlija bojājumi, elpceļu gludās muskulatūras hipertrofija [80, 142, 232, 260, 284, 426], gļotu dziedzeru hipertrofija [80, 142], epitēlija kausšūnu skaita palielināšanās [5, 456], retikulārās bazālās membrānas sabiezēšana [111, 142, 367], bronhu vazodilatācija, hipervaskularizācija, asinsvadu caurlaidības palielināšanās [54, 256, 426], un ekstracelulārā matricas remodelācija [192]. Iekaisumšūnu sastāvs un citokīnu gēnu ekspresija alerģiskai un nealerģiskai astmai, iespējams, ir līdzīgi, kaut arī IL-4 klātie nealerģiskas astmas gadījumā ir diskutējama [42, 43, 171, 236, 238, 521, 545]. Iekaisums hroniskas astmas gadījumā ir daudz komplikētāks nekā vienkāršs eozinofils iekaisums [250]. Šai procesā iesaistītas tādas elpceļu šūnas kā T limfocīti, eozinofīlie leikocīti, neitrofilie leikocīti, tuklās šūnas, bazofīlie leikocīti, makrofāgi, fibroblasti, epitēlijšūnas, bronhu gludās muskuļšūnas [54].

#### 1.1.2.1. Bronhu epitēlijšūnas

Hroniskas astmas gadījumā bronhu epitēlijs ir bojāts [287, 367]. Uz to netieši norāda arī astmas slimnieku ierosinātajās krēpās novērotā būtiski palielinātā albumīna koncentrācija, kas savukārt liecina par bronhu asinsvadu endotēlija un epitēlija caurlaidības palielināšanos [516]. Skropstiņepitēlija šūnas bieži ir pietūkušas, vakuolizētas un zaudējušas skropstiņas [287, 337], kā arī to dzīvotspēja ir vājināta [76]. Dati par bronhiālo epitēlija šūnu skaitu ierosinātajās krēpās ir visai pretrunīgi. Vieni autori astmas slimnieku ierosinātajās krēpās novērojuši būtiski palielinātu bronhu epitēlijšūnu skaitu salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [69, 482] un HOPS slimniekiem, lai gan starp astmas slimniekiem un veseliem cilvēkiem Luī šādu atšķirību nenovēro [310]. Tas liecina par bronhu epitēlija bojājumiem astmas gadījumā. Turpretī citi autori nav konstatējuši ticamas atšķirības starp astmas, HOPS slimnieku un veselu cilvēku bronhu epitēlijšūnu relatīvo un absolūto skaitu ierosinātajās krēpās [26, 182, 310, 469, 516]. Astmas slimnieku bronhu epitēlijā ir arī palielināts kausšūnu skaits [111, 368, 456]. Bronhu epitēlija bojājumu cēloņi astmas



gadījumā vēl ir samērā neskaidri. Tos, iespējams, izraisa eozinofilo leukocītu granulu proteīni- MBP, ECP [189, 484], tuklo šūnu proteolītiskie enzīmi [446], makrofāgu metaloproteāzes [324], TNF- $\alpha$ , brīvie reaktīvie skābekļa un slāpekļa savienojumi [271].

Bronhu epitēlijam ir būtiska nozīme elpceļu antioksidatīvās aizsardzības nodrošināšanā. Palielinātais eGPx mRNS līmenis astmas slimnieku elpceļu epitēlijšūnās norāda, ka šīm šūnām ir būtiska nozīme eGPx sintēzē [101]. Pētījumos *in vitro* noskaidrots, ka eGPx mRNS sintēzi būtiski palielina aktīvie skābekļa savienojumi (ROS) un glutations [101]. Bez tam bronhu epitēlijšūnu antioksidatīvajā aizsardzībā piedalās intracelulārie antioksidanti Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, katalāze un GPx. Kā norāda H. De Rēve un L. Smits, CAT un GPx aktivitāte būtiski neatšķiras astmas slimnieku un kontrolgrupas dalībnieku bronhu epitēlijšūnās, bet SOD aktivitāte [121, 467], un tieši Cu-Zn-SOD aktivitāte, bija vājināta astmas slimniekiem [121]. Turpretī ne Cu-Zn-SOD mRNS, ne Mn-SOD mRNS, ne pašu enzīmu koncentrācija starp grupām neatšķīrās, kas liecina par astmatiska iekaisuma izraisītu Cu-Zn-SOD aktivitātes zudumu, iespējams, oksidantu ietekmē [121]. Turpretī glutaciona koncentrācijai un glutaciona reduktāzes aktivitātei nav novērotas atšķirības starp astmas slimnieku un veselu cilvēku bronhu epitēliju [467]. HO-1 un HO-2 (hēma oksigenāze-1 un -2) ir plaši izplatīti enzīmi elpceļu epitēlijšūnās, kas katabolizē hēmu, veidojot CO un biliverdīnu, un, iespējams, tie ir nozīmīgi elpceļu epitēlija endogēniski antioksidatīvi enzīmi [303]. Lai gan to koncentrācija un izplatība būtiski neatšķīrās astmas un veselu cilvēku bronhu biopsijās [303]. Kā liecina pētījumi ar dzīvniekiem, bronhu skropstiņepitēlija intracelulārajam cinkam kā neenzimātiskam antioksidantam ir nozīme elpceļu antioksidatīvajā aizsardzībā, kura deficītam vai epitēlija bojājumam, iespējams, ir nozīme astmas attīstībā [505].

Bez elpceļu aizsardzības funkcijas, iekaisuma mediatoru vai reaktīvo skābekļa un slāpekļa savienojumu aktivētas, bronhu epitēlijšūnas var izdalīt prostaglandīnus [57]- PGE<sub>2</sub>, [76], endotelīnu, citokīnus- eotaksīnu [302, 551], IL-5 [437], IL-16 [15], IL-6, IL-8, GM-CSF, RANTES [37, 107], augšanas faktorus- VEGF [380], IGF-I [75], kā arī ekspresēt tā receptorus [87], adhēzijas molekulas- sICAM-1 [37], ekstracelulārā matricas proteīnus- fibronektīnu [76] un tenascīnu [213], metaloproteāzes (A un B gelatināzes) [542], kas veicina iekaisuma attīstību, elpceļu obstrukciju un remodelāciju [350]. Bez tam iekaisuma citokīnu un oksidantu ietekmē aktivētas bronhu epitēlijšūnas ar transkripcijas faktora NF-kB starpniecību [32] var

pastiprināt iNOS ekspresiju astmas gadījumā, tāpēc arī palielinās NO sintēze un koncentrācija izelpas gaisā [33, 240, 435, 548]. NO, sintezēts palielinātā daudzumā, var darboties ne tikai par mediatoru, izraisot bronhu hiperēmiju, plazmas eksudāciju, gļotu hipersekreciju [32], bet arī citotoksiski, reaģējot ar superoksīdu un veidojot peroksinitrītu, kas ir spēcīgs oksidants [435].

### **1.1.2.2. Eozinofīlie leukocīti**

Gan alerģiska, gan nealerģiska bronhiālā astma pārsvarā saistīta ar bronhu eozinofiliju [156, 167, 169]. Astmas smaguma pakāpe un bronhu hiperreaktivitāte korelē ar eozinofilo leukocītu skaitu un to aktivāciju bronhos [58, 143, 169, 196, 309]. Eozinofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās saistīts ar astmas smaguma pakāpi un astmas slimniekiem ticami negatīvi korelē ar FEV<sub>1</sub>% [169, 205, 309, 469]. Asins eozinofilo leukocītu skaitam šāda korelācija nav novērota [469]. Palielinātu eozinofilo leukocītu skaitu novēro arī astmas slimnieku bronhu biopsijās [58, 289, 352]. Bez tam konstatēts palielināts eozinofilo leukocītu skaits astmas slimnieku BAL šķidrumā [159, 204] un BW [159]. Arī eozinofilo leukocītu skaits astmas slimnieku ierosinātās krēpās ir krietni palielināts [159, 169, 183, 185, 266, 295, 387, 393, 469]. Eozinofilo leukocītu relatīvais skaits ierosinātās krēpās ticami korelē ar to relatīvo skaitu BAL [204, 316] un BW [204, 266], bet mazāka korelācija vērojama starp eozinofilo leukocītu absolūto skaitu ierosinātās krēpās un bronhu biopsijās [204, 316]. Pie tam ierosinātās krēpās eozinofilo leukocītu relatīvais skaits astmas slimniekiem būtiskāk atšķīrās no kontrolgrupas nekā BAL vai BW šķidrumā [159, 266], kas liecina par ierosināto krēpu metodes labāku piemērotību alerģiska iekaisuma vērtēšanā. Astmas slimniekiem novēro arī pastiprinātu asins eozinofiliju, lai gan tā ir mazāk izteikta [295].

Kaut arī palielināts eozinofilo leukocītu skaits astmas gadījumā ir raksturīga pazīme, tomēr tā nav specifiska tikai astmai, kā arī nav vienmēr sastopama astmas gadījumā. Kā norāda Lakosta eozinofilo leukocītu skaits bronhu sienas biopsijās astmas slimniekiem būtiski neatšķīrās no hroniska bronhīta un HOPS slimniekiem, bet astmas gadījumā eozinofīlie leukocīti bija degranulējušies [286]. Arī daļai HOPS slimnieku ierosinātās krēpās novērots palielināts eozinofilo leukocītu skaits [26, 62] un ECP koncentrācija [26]. Palielināts eozinofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās konstatēts eozinofīlā bronhīta gadījumā bez astmas vai HOPS simptomātikas [212]. Arī bronhīta paasinājuma gadījumā atklāta bronhu audu eozinofilija [251]. Palielināta

krēpu eozinofīlija novērota 92% astmas, 36% HOPS un 28% slimnieku ar hronisku klepu [233].

Pētījumos *in vitro* ar IL5 aktivēti eozinofīlie leukocīti palielina LTC<sub>4</sub> sintēzi [36, 106]. No astmas slimnieku BAL izolētiem eozinofīliem leukocītiem ir palielināta arahidonskābes koncentrācija, kā arī pastiprināta LTC<sub>4</sub> sintāzes aktivitāte, kas norāda uz cisteīn leukotriēnu (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) palielinātu sintēzi [71]. Arī astmas slimnieku ierosinātās krēpās novēro būtiski palielinātu LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> koncentrāciju [375].

Astmas slimnieku BAL un ierosināto krēpu šūnu pētījumos aktivētos eozinofīlos leukocītos notiek pastiprināta IL-4, IL-5, GM-CSF un eotaksīna mRNS sintēze, kas liecina par pastiprinātu šo citokīnu izdalīšanu [63, 544, 551], un, iespējams, tiem ir nozīme autokrīnā eozinofīlo leukocītu regulācijā, kā arī eozinofīlo leukocītu un citu šūnu migrācijā un aktivācijā.

Eozinofīlie leukocīti var izdalīt arī augšanas faktoros TGFβ<sub>1</sub> un TGFα kas var izraisīt elpceļu pārstrukturēšanos- fibrozi un bazālās membrānas sabiezēšanu, neovaskularizāciju, iedarbojoties uz epitēlijšūnām, fibroblastiem un asinsvadu endotēlijšūnām [364, 525]. Pētījumos *in vitro* GM-CSF un IL-3 būtiski palielina TGFα mRNS ekspresiju eozinofīlos leukocītos un, iespējams, tie piedalās šā proteīna sintēzes regulācijā eozinofīlos leukocītos [526].

Aktivēti eozinofīlie leukocīti izdala toksiskus proteīnus ECP, MBP un END kam ir būtiska nozīme bronhu epitēlija bojājumu izraisīšanā [189, 190]. ECP, MBP un END koncentrācija astmas slimnieku ierosinātās krēpās, kā arī BAL ir būtiski palielināta [8, 156, 159, 169, 295, 390, 478]. Bez tam ECP koncentrācija ierosinātās krēpās ticami pozitīvi korelē ar astmas smaguma pakāpi [169, 196] un eozinofīlo leukocītu skaitu [184, 196]. Pētījumos *in vitro* MBP palielina PGE<sub>2</sub> izdalīšanos no epitēlijšūnām, un var kavēt mukociliāro klīrensu, mainot elpošanas trakta šķidrums sastāvu (palielināta Cl<sup>-</sup> izdalīšanās) un izdalīšanās ātrumu no epitēlijšūnām [243]. Bez tam MBP var izraisīt alveolu epitēlijšūnu bojājumus [23].

Tāpat kā neitrofilie leukocīti, arī eozinofīlie leukocīti var izdalīt proteāzes piemēram elastāzi [313] un, MMP-9 [365].

Astmas slimnieku ierosinātās krēpās atklāta būtiski paaugstināta MMP-9 un MMP-2 aktivitāte, kā arī paaugstināts TIMP-1 [83, 479] un α<sub>1</sub>-antitripsīna līmenis [516]. Turpretī Van Vive astmas slimnieku BAL novēro pazeminātu α<sub>1</sub>-antitripsīna līmeni [513]. Iespējams, šīs metaloproteāzes ir iesaistītas plaušu audu ekstracelulārā matricā

pārstrukturēšanā un fibrozes attīstībā, ko varētu būt izraisījis proteāžu un antiproteāžu sistēmas līdzsvara trūkums. [517]. Kaut arī antiproteāžu līmenis ir paaugstināts, tās nespēj pietiekami inhibēt proteāžu darbību.  $\alpha_1$ -antitripsīna aktivitāti arī būtiski var mazināt brīvie skābekļa radikāļi, kas izdalās no aktivētām iekaisumšūnām [79, 523].

Astmas slimniekiem ir būtiski palielināta NO un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koncentrācija izelpas gaisā, un tā ticami korelē ar eozinofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās [229]. Eozinofilie leukocīti, tāpat kā makrofāgi un bronhu epitēlijs iekaisuma gadījumā sintezē NO, par ko liecina eozinofilos leukocītos atrastā iNOS mRNS [123, 524, 543]. Eozinofilos leukocītus uzskata par vienu no galvenajiem NO izcelsmes oksidantu NO<sup>2-</sup>, NO<sup>3-</sup> avotiem smagas astmas gadījumā, un, iespējams, EPO ir enzimatisks starpnieks nitrēšanā [315, 538]. EPO varbūt iesaistīta arī tirozīna nitrēšanā, un tā ir efektīvāka par neitrofilo leukocītu MPO [342, 538]. Bez tam EPO, tāpat kā MPO, katalizē hipohlorskābes, hipobromskābes, hipotiociānātu veidošanos, kuri arī ir ļoti spēcīgi oksidanti [512]. Eotaksīnam- CC hemokīnam- ir nozīme ne tikai eozinofilo leukocītu hemotaksē, bet arī skābekļa radikāļu izdalīšanas indukcijā no eozinofiliem leukocītiem [151]. Atkarībā no stimula aktivēti eozinofilie leukocīti, aprēķinot uz vienu šūnu, var izdalīt vairāk superoksīda anjona radikāļu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) nekā neitrofilie leukocīti vai makrofāgi [447]. Bez tam ar alergēnu aktivēti astmas slimnieku eozinofilie leukocīti izdala palielinātu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [152]. Palielinātā skābekļa un slāpekļa radikāļu producēšana var izjaukt oksidantu un antioksidantu līdzsvaru, izsauc oksidatīvo stresu. Šie skābekļa un slāpekļa radikāļi izraisa elpceļu epitēlijšūnu un ekstracelulārā matricsa bojājumus, kas sekmē iekaisuma veidošanos, elpceļu pārstrukturēšanu un obstrukciju.

Asins eozinofilo un neitrofilo leukocītu glutaciona peroksidāzes aktivitāte būtiski atšķirās bronhiālās astmas slimniekiem un kontrolgrupā- GPx aktivitāte un GPx mRNS ekspresija bija lielāka eozinofilajos nekā neitrofilajos leukocītos [336]. Eozinofilo leukocītu GPx aktivitāte ticami korelēja ar asins eozinofilo leukocītu skaitu vienīgi astmas slimnieku grupā [336]. Pastiprinātā eozinofilo leukocītu GPx ekspresija, iespējams, nodrošina to aizsardzību pret šo šūnu izdalīto oksidantu iedarbību, kurus eozinofilie leukocīti izdala vairāk nekā neitrofilie leukocīti, nodrošinot to ilgāku izdzīvošanu audos astmas gadījumā [336]. Par to liecina arī mazāks apoptotisko eozinofilo leukocītu skaits astmas slimnieku ierosinātās krēpās, kas norāda, ka apoptoze ir mazāk efektīva hroniska eozinofila iekaisuma gadījumā [167].

### 1.1.2.3. Limfocīti

Bronhu biopsijās astmas slimniekiem novēro palielinātu aktivētu CD25+ T limfocītu skaitu, kuru izdalītie produkti, iespējams, regulē eozinofilo leukocītu migrāciju [58]. Astmas slimnieku ierosinātās krēpās ir būtiski palielināts šūnu skaits, kuras ekspresē IL-4 un IL-5 mRNS, un galvenais šo citokīnu avots ir CD3+ Th2 limfocīti [366], līdzīgi arī astmas slimnieku bronhu biopsijās un BAL krēpās ir būtiski palielināts šūnu skaits, kuras ekspresē IL-4 un IL-5 mRNS, un 70% šo šūnu ir CD3+, CD4+ Th2 limfocīti [124, 419, 544]. Arī CD8+ T limfocīti (Th1) var ekspresēt IL-4, IL-5 mRNS [545] un CD40L receptorus [103], kas liecina par to iespējamu spēju ieslēgt B limfocītus uz IgE sintēzi, lai gan Th1 limfocītu daudzums ir mazāks un parasti neatšķiras astmas slimnieku un veselu cilvēku grupās [104, 544], bet vairāk satopami HOPS slimnieku elpceļu biopsijās [369]. Astmas slimnieku BAL šķidrumā un bronhu biopsijās alergiskas astmas gadījumā palielinātā daudzumā sintezējas IL-4, IFN- $\gamma$  un IL-5 (Th2), bet nealergiskas astmas gadījumā- IL-2, IFN- $\gamma$  un IL-5 (Th1) [124, 522], lai gan citiem autoriem ir pretēji rezultāti [236].

Citokīniem IL-5 un GM-CSF ir būtiska nozīme eozinofilo leukocītu aktivācijā, kā arī IL-5 palielina CysLT(1)R leukotriēnu receptoru ekspresiju eozinofilos leukocītos tā pastiprinot to jutību pret LTD<sub>4</sub> [494]. Savukārt IL-4 piedalās Th2 un B limfocītu aktivācijā un alergiskā iekaisuma paplašināšanā.

Aktivēti limfocīti var izdalīt arī oksidantus, par ko liecina pētījumi, izmantojot šūnu hemiluminiscenci. Būtiski palielināta asins limfocītu hemiluminiscence novērota astmas slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem, un tā īpaši palielināta nakts laikā [210].

### 1.1.2.4. Tuklās šūnas un bazofilie leukocīti

Palielināts tuklo šūnu skaits novērots aspirīna astmas slimnieku bronhu biopsijās [352], ierosinātās krēpās (metahromatiskās šūnas) [390] un BAL šķidrumā [82]. Tuklās šūnas astmas slimnieku elpceļos bieži ir degranulējušās gan stabilas fāzes laikā, gan pēc alergēna iedarbības [38]. Lai arī tuklajām šūnām akūtas astmas gadījumā ir galvenā nozīme, izraisot bronhu konstrikciju, tūsku un gļotu hipersekreciju (sk. 1.1.1. Akūts alergisks iekaisums), to nozīme hroniskas astmas gadījumā ir samērā neskaidra.

Tuklās šūnas un bazofilie leukocīti tāpat kā TH2 un eozinofilie leukocīti aktivējoties var ekspresēt IL-4, IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$  mRNS [56, 361, 545]. Tuklās

šūnas un bazofilie leukocīti aktivējoties spēj ekspresēt arī CD40L receptorus (tāpat kā Th2 limfocīti), kas, saistoties ar CD40 uz B limfocītu virsmas, var tos pārslēgt uz IgE sintēzi un proliferāciju neatkarīgi no Th2 limfocītiem [178, 541]. Bez tam tuklo šūnu un bazofilo leukocītu CD40L receptori var saistīties ar elpceļu epitēlijšūnu CD40 molekulām, piedaloties imūnatbildes regulācijā [547]. Iespējams, šim mehānismam ir nozīme hroniska alerģiska iekaisuma regulācijā [54].

Tuklajām šūnām, iespējams, ir nozīme elpceļu remodelācijā. Tuklo šūnu izdalītie produkti- triptāze un histamīns - *in vitro* veicina fibroblastu migrāciju, aktivāciju un proliferāciju [206, 348, 421]. Triptāze ir mitogēns epitēlijšūnām, izraisa IL-8 sintēzi, ICAM-1 ekspresiju, veicina epitēlija reparāciju un granulocītu piesaistīšanu elpceļos [70]. Tuklās šūnu izdalītie produkti var veicināt angiogēnēzi, tieši iedarbojoties uz endotēlijšūnām- veicinot to migrāciju un proliferāciju [328]. Par vienu no šādiem iespējamiem faktoriem tiek minēta triptāze [47]. Bez tam grauzēju tuklās šūnas un bazofilie leukocīti *in vitro* var izdalīt arī bazālās membrānas sastāvdaļas- laminīnu un kolagēnu IV [499], kam, iespējams, varētu būt nozīme bazālās membrānas sabiezēšanā astmas gadījumā.

### 1.1.2.5. Neitrofilie leukocīti

Neitrofilo leukocītu nozīme astmas gadījumā ir visai pretrunīga. Daļa autoru norāda, ka astmas gadījumā ierosinātās krēpās ir būtiski palielināts neitrofilo leukocītu relatīvais skaits [127, 390, 516], citi turpretī novērojuši tikai nelielu nebūtisku to skaita palielinājumu [68, 264, 387] salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem. To, iespējams, varētu skaidrot ar dažādu astmas smaguma pakāpi, jo ticami vislielākais neitrofilo leukocītu skaits ir tieši smagas astmas [248, 440], arodastmas (mazmolekulāru vielu izsauktas astmas) gadījumā [127], bez tam arī astmas paasinājuma [158, 211], un elpošanas trakta infekcijas gadījumā var palielināties neitrofilo leukocītu skaits [158, 394]. Turpretī BAL šķidrums, un bronhu biopsijās astmas slimniekiem nav būtiski palielināts neitrofilo leukocītu skaits salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [58, 286, 397]. Arī BAL un BW neitrofilo (arī eozinofilo) leukocītu relatīvais skaits parasti ir daudz mazāks nekā ierosinātās krēpās gan astmas, HOPS slimnieku, veselu nesmēķētāju un smēķētāju grupā [266, 316, 392]. Šīs atšķirības, iespējams, var skaidrot ar to, ka ierosinātās krēpas pārsvarā atspoguļo procesu lielākos elpceļos- trahejā un bronhos, turpretī BAL un BW- distālākos elpceļos un alveolās [266].

Neitrofilie leukocīti var izdalīt leikotriēnus  $LTA_4$ ,  $LTB_4$  [434, 510], citokīnus IL-1, IL-6, IL-8 TNF- $\alpha$ , kam ir nozīme neitrofilo leukocītu, monocītu u.c. šūnu piesaistīšanā elpceļos un aktivācijā [158, 319, 440]. Arī ierosinātās krēpās smagas astmas gadījumā ir paaugstināts IL-8 līmenis [158, 248, 374], lai gan tā avoti var būt dažādi – neitrofilie leukocīti, makrofāgi, bronhu epitēlijšūnas u.c. Neeozinofilas astmas gadījumā, kad ir būtiski palielināts neitrofilo leukocītu absolūtais un relatīvais skaits, salīdzinot ar eozinofilās astmas slimniekiem un veseliem cilvēkiem, arī IL-8 koncentrācija ierosinātās krēpās ir būtiski palielināta un korelē ar neitrofilo leukocītu skaitu [186]. Tas norāda uz iespējami atšķirīgiem elpceļu iekaisuma mehānismiem eozinofilas un neitrofilas astmas gadījumā [186]. Bez tam endotēlijšūnas starpšūnu mijiedarbība ar neitrofilu leukocītiem var izraisīt  $LTA_4$  sintēzi neitrofilos leukocītos un mijiedarbības gaitā veicināt to adhēziju pie endotēlija, radot mikrovaskulāras pārmaiņas [434].

Astmas slimnieku ierosinātās krēpās ir būtiski palielināta gan vispārējā, gan aktīvas elastāzes koncentrācija, kas ticami korelē ar absolūto un relatīvo neitrofilo leukocītu skaitu un apgriesti korelē ar  $FEV_1\%$  no normas [516], kas liecina, ka galvenais elastāzes avots ir neitrofilie leukocīti [95, 516], un, iespējams, tiem ir nozīme elpceļu obstrukcijas attīstībā astmas gadījumā [516]. Bez tam astmas slimnieku ierosinātās krēpās elastāzes koncentrācija korelē ar  $\alpha_1$ -antitripsīna līmeni, kas arī ir paaugstināts astmas slimniekiem [516]. Paaugstinātais  $\alpha_1$ -antitripsīna līmenis iespējams, ir kompensatorisks mehānisms lielajai elastāzes aktivitātei [516]. Bez tam  $\alpha_1$ -antitripsīnu var inaktivēt oksidanti [79, 318]. Īpaši jutīga pret oksidantiem ir  $\alpha_1$ -antitripsīna metionīna saite [79]. Arī palielināta  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija, ja tā daļa tiek inaktivēta ar oksidantiem, var būt nepietiekama, lai pietiekami inhibētu proteāzes, un var veidoties proteāžu un antiproteāžu līdzsvara trūkums. Par to liecina arī elastīgo šķiedru pārrāvumi astmas slimnieku bronhos [53]. Bez tam arī bronhu epitēlijšūnu bojājumus var izraisīt tādi neitrofilo leukocītu produkti kā kolagenāze, Cath-G un elastāze [330].

Astmas slimnieku BAL [267] un asins [210] neitrofilos leukocītos novērota būtiski palielināta pēc aktivācijas maksimālā luminol- atkarīgā hemiluminiscence, kas norāda uz pastiprinātu skābekļa radikāļu izdalīšanos no šīm šūnām. Astmas slimnieku ierosinātās krēpās novērota būtiski palielināta MPO, un HNL koncentrācija [265], kā arī MPO aktivitāte un neitrofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās, kaut gan vāji tomēr korelē attiecīgi ar PEF variabilitāti un simptomu smagumu [309]. Neitrofilā MPO

katalizē HOCl (hipohlorskābes) veidošanos no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un Cl<sup>-</sup>, kas tiek uzskatīta par vienu no spēcīgākajiem oksidantiem [35, 209, 218]. Bez tam neitrofilie leukocīti izdala arī radikāļus, piemēram, O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superoksīda anjonu) [64]. Neitrofiliem leukocītiem, iespējams, ir nozīme tādu brīvo radikāļu izdalīšanā kā NO, par to liecina neitrofilos leukocītus atrastā ncNOS (NOS1) [524]. Arī izelpas gaisā astmas slimniekiem, kuri nav saņēmuši kortikosteroīdus, ir paaugstināts NO līmenis [248], lai gan tā produkcijā, iespējams, lielāka nozīme ir bronhu epitēlijšūnām. Oksidantu pastiprinātā izdalīšanās var izjaukt oksidantu un antioksidantu līdzsvaru plaušās, izraisot oksidatīvo stresu.

### 1.1.2.6. Makrofāgi

Bez jau iepriekš minētās makrofāgu būtiskās nozīmes akūtas astmas gadījumā, tiem, iespējams, ir būtiska nozīme arī hroniskas alerģiskas un nealerģiskas astmas gadījumā [43, 397]. Par to liecina astmas slimnieku bronhu biopsijās būtiski palielinātais infiltrētu makrofāgu skaits elpceļu gļotādā [397, 398], kas īpaši palielināts nealerģiskas astmas gadījumā [43]. Palielināts makrofāgu skaits novērots arī aspirīna astmas slimnieku bronhu biopsijās [352]. Astmas slimnieku ierosinātās krēpās ir būtiski [241, 387], vai citiem nedaudz [264] mazināts makrofāgu relatīvais skaits, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem. Tas varētu būt uz eozinofilo un neitrofilo leukocītu relatīvā skaita pieauguma rēķina, nemainoties makrofāgu absolūtajam skaitam. Astmas slimnieku BAL šķidrums nav būtisku pārmaiņu makrofāgu absolūtajā skaitā [267, 471]. Turpretī smēķējošu astmas slimnieku tāpat kā veselu smēķētāju BAL šķidrums ir ticami divreiz palielināts makrofāgu absolūtais skaits salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [267]. Astmas (paasinājuma gadījumā) slimnieku ierosinātās krēpās ir vājināta mononukleāro šūnu apoptoze salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem un HOPS slimniekiem [211]. Tas liecina par to palielināto dzīves ilgumu astmas gadījumā. Turpretī citos pētījumos astmas slimnieku BAL novērota vājināta alveolāro makrofāgu dzīvotspēja, kas negatīvi korelē ar eozinofīlu relatīvo skaitu BAL. Tas norāda uz iespējamu mijiedarbību starp šīm šūnām [191]. BAL makrofāgu relatīvais skaits parasti ir daudz lielāks nekā ierosinātās krēpās gan astmas, gan hroniska bronhīta un HOPS slimnieku grupā [266, 316, 392]. Šīs atšķirības var skaidrot tā, ka ierosinātās krēpas pārsvarā atspoguļo procesus lielākos elpceļos, bet BAL- distālos elpceļos un alveolās, kur vairāk dominē alveolārie makrofāgi [266].



Kaut arī alveolāro makrofāgu skaits astmas slimnieku BAL šķidrumsā nav palielināts, tiem ir pastiprināta aktivitāte [51, 85, 172], kas korelē ar astmas smaguma pakāpi [93, 267]. Endobronhiāla iedarbība ar alergēnu strauji aktivē alveolāros makrofāgus [331, 500]. No BAL iegūti alveolārie makrofāgi, *in vitro* sensitivizēti ar alergēnspecifisku seruma IgE, aktivējas pēc saskares ar attiecīgo alergēnu [257]. Kā vēlāk novēroja bronhu biopsijās, uz makrofāgu virsmas ir zemas afinitātes FcεRII IgE receptori [535] un augstas afinitātes FcεRI IgE receptori [237]. Gan FcεRI IgE, gan FcεRII IgE receptorus saturošo makrofāgu un monocītu skaits bija būtiski palielināts astmas slimniekiem [237, 535]. Monocītu FcεRII IgE receptoru ekspresiju būtiski palielina tādi mediatori kā IL-4, GM-CSF, M-CSF, IFN-α, IFN-γ [535].

Alveolārie makrofāgi ekspresē augstas afinitātes LTD<sub>4</sub> receptorus. LTD<sub>4</sub>, iespējams, ir imūnmodulācijas efekts uz alergēnaktivētiem makrofāgiem palielinot to izdalīto iekaisuma mediatoru MIP-1α, TNFα mRNS ekspresiju un pašu mediātoru izdalīšanos, kā arī NO sintēzes pieaugumu [329]. Bronhu zemgļotādā mononukleārās šūnas ekspresē ICAM-1 mRNS, kam, iespējams, ir nozīme eozinofilo leukocītu infiltrācijā astmas gadījumā [362].

Alveolārie makrofāgi, iespējams, arī var supresēt imūnatbildi un iekaisumu [18, 399, 504]. Alveolārie makrofāgi var mazināt iekaisumu izdalot acetilhidrolāzi, kas ir spēcīgs PAF inaktivators (pārvēršot lyso-PAF). BAL šķidrumsā astmas slimniekiem ir būtiski vājāka ekstracelulārās acetilhidrolāzes aktivitāte nekā veseliem cilvēkiem, bet fibrozes gadījumā ir būtiski pastiprināta šī fermenta aktivitāte. Bez tam acetilhidrolāze ir ārkārtīgi jutīga pret skābekļa radikāļiem, kas to sagrauj. Iespējams, ka vājinātā šā enzīma aktivitāte astmas gadījumā skaidrojama ar tā sintēzes un degradācijas līdzsvara trūkumu [504].

Makrofāgi var būt iesaistīti elpceļu iekaisuma un tam sekojošas elpceļu obstrukcijas attīstībā, izdalot iekaisuma mediatorus. Aktivēti alveolārie makrofāgi izdala TxB<sub>2</sub> [172], LTB<sub>4</sub>, [114, 172], pie tam astmas slimniekiem 5-HETE (5-hidroksieikozatetroneiskābes) koncentrācija makrofāgos un LTB<sub>4</sub> izdalīšanās no alveolārajiem makrofāgiem ir palielināta, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [114]. LTB<sub>4</sub> ir spēcīgs hemotakses un aktivācijas faktors eozinofiliem, neitrofiliem leukocītiem un monocītiem [329, 349]. Astmas slimnieku BAL šķidrumsā ir būtiski paaugstināta IL-1β koncentrācija, un, kā noskaidrots, IL-1β mRNS ekspresē aktivēti astmas slimnieku alveolārie makrofāgi [51]. Bez tam astmas slimnieku alveolārie makrofāgi izdala vairāk IL-1, IL-6, TNF-α nekā veseli nesmēķētāji [85]. TNF-α,

iespējams, ir būtiska nozīme neitrofilo un eozinofilo leukocītu piesaistīšanā elpceļos [215]. Nealerģiskas astmas slimnieku ierosināto krēpu makrofāgi ekspresē eotaksīnu. Eotaksīna mRNS+ šūnu (makrofāgu, eozinofilo leukocītu, epitēlijšūnu) skaits korelē ar eozinofilo leukocītu skaitu krēpās, kas, iespējams, norāda uz tā nozīmi elpceļu eozinofilijas attīstībā astmas gadījumā [551]. Aktivēti monocīti un makrofāgi izdala PAF [16], kas ir spēcīgs bronhokonstriktors, izraisa citu iekaisuma mediātoru izdalīšanos un regulē adhēzijas molekulu ekspresiju citās šūnās [353].

Makrofāgi var būt iesaistīti arī procesos, kas veicina gļotu hipersekrēciju elpceļos. Steroīdatkarīgas astmas slimnieku, hroniska bronhīta un smēķētāju BAL šķidruma mononukleāro šūnu kultūrā novērots būtiski paaugstināts MMS-68 līmenis salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem. MMS-68 veicina gļotu sekrēciju elpceļos un no respiratorajām epitēlijšūnām [470]. Turpretī vieglas astmas gadījumā, kas nav saistīta ar gļotu hipersekrēciju, BAL šķidrumā nenovēro būtiski palielinātu MMS-68 koncentrāciju [471].

Bez tam makrofāgi var iesaistīties elpceļu remodelācijā, izdalot augšanas faktoros, fibrinolīzes inhibitoros, matriksa metaloproteāzes un skābekļa un slāpekļa radikāļus.

Salīdzinājumā ar veselu cilvēku BAL no astmas slimnieku BAL iegūti alveolārie makrofāgi izdala būtiski vairāk TGF- $\beta$  un fibronektīnu, lai gan visintensīvākā TGF- $\beta$  un fibronektīna izdalīšanās novērota no hroniska bronhīta slimnieku alveolāriem makrofāgiem [514]. No BAL iegūti alveolārie makrofāgi ekspresē arī PDGF- $\beta$  mRNS, lai gan ekspresija neatšķīrās astmas slimnieku un veselu cilvēku grupā [489]. Šie augšanas faktori, iedarbojoties uz fibroblastiem, bronhu epitēlijšūnām un asinsvadu endotēlijšūnām, var izraisīt fibrozi un elpceļu remodelāciju.

Astmas slimnieku aktivēti makrofāgi izdala proteolītisku enzīmus MMP-9 [324, 517], NAG [172]. MMP-9 ir elastolītiska un kolagenolītiska aktivitāte [324]. MMP-9 un antiproteāzes TIMP-1 koncentrācija astmas un hroniska bronhīta slimnieku ierosinātās krēpās bija būtiski lielāka salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [517]. Arī astmas slimnieku BAL šķidrumā un alveolāro makrofāgu supernatantā, nosakot imunoloģiski, MMP-9 līmenis bija būtiski paaugstināts [324]. Molārā attiecība MMP-9 un TIMP-1 bija mazāka astmas un hroniska bronhīta slimniekiem nekā kontrolgrupai un pozitīvi korelēja ar FEV<sub>1</sub> līmeni [517]. Bez tam MMP-9 aktivitāte korelē ar makrofāgu un neitrofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās

[517]. Tas norāda, ka elpceļu iekaisums astmas un hroniska bronhīta gadījumā saistīts ar MMP-9 un TIMP-1 līdzsvara trūkumu, un tam, iespējams, ir nozīme ekstracelulārā matricisa remodelācijā un elpceļu obstrukcijas attīstībā [517].

Astmas slimnieku BAL makrofāgos novērota būtiski pastiprināta gan bazālā luminolatkarīgā hemiluminiscence [93], gan pēc aktivācijas maksimālā luminolatkarīgā hemiluminiscence [93] un lucigenīnatkarīgā hemiluminiscence [267], kas norāda uz pastiprinātu skābekļa radikāļu izdalīšanos no šīm šūnām. Novērota arī ticama korelācija starp astmas smaguma pakāpi un aktivētu makrofāgu maksimālo luminolatkarīgo [93] un lucigenīnatkarīgo hemiluminiscenci [267], kas liecina par makrofāgu izdalīto skābekļa radikāļu nozīmīgumu bronhu iekaisuma attīstībā astmas gadījumā [93].

Aktivēti alveolārie makrofāgi izdala tādu spēcīgu oksidantu kā  $O_2^{\cdot -}$  (superoksīda anjona radikāli) [72, 172]. BAL šķidrumā  $O_2^{\cdot -}$  producēšanas diennakts cikls būtiski korelē ar FEV<sub>1</sub> pārmaiņām diennakts laikā astmas slimniekiem ar nakts lēkmēm [246]. Astmas slimnieku BAL alveolārajos makrofāgos ir pastiprināta iNOS sintēze, kas liecina par intensīvu NO izdalīšanos no šīm šūnām [548]. Aktivēti astmas slimnieku asins monocīti, nosakot hemiluminometriski suspensijā, izdala vairāk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un  $O_2^{\cdot -}$ , kā arī kopējo brīvo radikāļu daudzumu nekā attiecīgi veselu cilvēku monocīti [509]. Gan nestimulēti, gan stimulēti astmas slimnieku asins monocīti, adhezēti uz virsmas, izdalīja vairāk  $O_2^{\cdot -}$  nekā attiecīgi veselu cilvēku monocīti [509]. Turpretī SOD aktivitāte adhezētajos asins monocītos bija būtiski vājāka astmas slimnieku grupai [509]. Tas norāda uz palielinātu oksidantu izdalīšanos un iespējamu oksidantu un antioksidantu sistēmas līdzsvara trūkumu, kas izraisa oksidatīvo stresu un iekaisumu astmas slimniekiem.

Makrofāgiem, iespējams, ir būtiska nozīme gan akūta, gan hroniska iekaisuma regulēšanā astmas gadījumā, gan regulējot imūnatbildi, šūnu migrāciju, aktivāciju un angioģenēzi [477], gan ekstracelulārā matricisa degradāciju un sintēzi [453].

### **1.1.2.7. Fibroblasti**

Kā zināms, fibroblastiem ir galvenā nozīme ekstracelulārā matricisa tapšanā veidojot kolagēnu, retikulārās un elastīgās šķiedras, kā arī amorfās šūnstarpu vielas sastāvdaļas- proteoglikānus, glikoproteīnus un glikozaminoglikānus [454]. Bez tam fibroblasti ir šūnas ar plašām proliferācijas un specializācijas iespējām, un tie var derēt par cilmsūnām dažādiem šūnu tipiem, piemēram, miofibroblastiem un,

iespējams, pat gludajām muskuļšūnām, kuru hiperplāzija novērota smagas astmas gadījumā [188]. Astmas slimniekiem, salīdzinot ar veselīgiem cilvēkiem, bronhu biopsijās retikulārā bazālā membrāna ir sabiezināta un tajā ir būtiski palielināts miofibroblastu skaits, kas ticami korelē ar šās membrānas biezumu [59, 173]. Astmas slimnieku bronhu biopsiju subepiteliālajā slānī dienu pēc iedarbības ar alergēnu miofibroblastu skaits būtiski pieaug, salīdzinot ar skaitu pirms iedarbības [188]. Pētījumos *in vitro* cilvēka plaušu fibroblasti var tikt aktivēti ar citokīniem IL-4 un IL-13 un ekspresēt uz šūnu virsmas adhēzijas molekulas  $\beta_1$ -integrīnu, VCAM-1, kā arī izdalīt citokīnus IL-6, MCP-1 [136]. No astmas slimnieku bronhu retikulārās bazālās membrānas iegūti miofibroblasti šūnu kultūrā izdalīja citokīnus IL-6, IL-8, GM-CSF, CSF, pie tam GM-CSF izdalīšanās būtiski pieauga pēc stimulācijas ar TNF- $\alpha$  [552]. Miofibroblasti, kultivēti kopā ar eozinofiliem leukocītiem būtiski palielina eozinofilo leukocītu izdzīvošanas laiku, jo miofibroblastu izdalītai GM-CSF inhibē apoptozi eozinofiliem leukocītiem [553]. Fibroblasti var ne tikai piedalīties plaušu audu remodelācijā, izdalot ekstracelulārā matricas sastāvdaļas elastīnu, fibronektīnu, laminīnu [297], bet arī aktīvi piedalīties iekaisumšūnu piesaistīšanā audos, aktivācijā un apoptozes inhibīcijā, gan ekspresējot adhēzijas molekulas, gan izdalot citokīnus un augšanas faktorus [136, 552, 553].

#### **1.1.2.8. Trombocīti**

Trombocītu nozīme astmas patoģenēzē ir samērā neskaidra [370]. Bronhu biopsijās vieglas astmas slimniekiem trombocīti kopā ar fibrīnu konstatēti bronhu epitēlija bojājuma vietās [249]. Aspirīna astmas slimniekiem [258] un nakts astmas lēkmju laikā [340] ir būtiski pastiprinātu trombocītu aktivitāte, kas apgriezti korelē ar PEF [340]. Daži autori uzskata, ka nakts astmas lēkmes varētu būt saistītas ar melatonīna koncentrācijas maiņu diennakts ciklā, kas mazā devā var aktivēt trombocītus [153]. Alerģiskas astmas slimnieku bronhu biopsijās trombocīti ir pielipuši pie asinsvadu endotēlija kopā ar eozinofiliem leukocītiem un monocītiem [38]. Nesen noskaidrots, ka pastāv starpšūnu kopdarbība lipoksigenāzes produktu sintēzē starp trombocītiem, leukocītiem un epitēlijšūnām [450]. Viens no šādas kopdarbības produktiem ir LX (lipoksīns)- trihidroksitetrānu saturošs eikosanoīds, kura kaskādes produkti regulē leukocītu migrāciju, kavējot akūtu audu iekaisumu [450]. Pētījumos *in vitro* aspirīna astmas slimnieku trombocīti pastiprināti izdala lipoksigenāzes produktus kā 12-HETE [395].

Aktivēti trombocīti var izdalīt arī skābekļa radikāļus. Ar PAF aktivēti astmas slimnieku trombocīti būtiski palielināja brīvo radikāļu izdalīšanos [395]. Trombocīti atrasti arī eNOS (NOSIII) [524], kas liecina par to spēju sintezēt NO.

Dati par trombocītu antioksidatīvās sistēmas aktivitāti astmas gadījumā ir visai pretrunīgi. Daļa autoru novēro vājinātu GPx aktivitāti nealerģiskas [216, 335] un alerģiskas [335] astmas slimniekiem un īpaši vājas alerģiskas astmas gadījumā [335]. Turpretī citi nekonstatē būtiskas trombocītu GPx aktivitātes atšķirības starp astmas slimniekiem un veseliem cilvēkiem [395, 475]. Līdzīgi novērojumi ir arī par GPx aktivitāti plazmā. Vieni autori atklāj vājinātu GPx aktivitāti alerģiskas astmas slimnieku plazmā [335], turpretī citi neatrod būtiskas atšķirības [475]. Iespējams, tas saistīts ar astmas smaguma pakāpi. GPx aktivitāte trombocītos ir vājka tikai smagas astmas slimniekiem [386]. Daļa autoru šo vājināto GPx aktivitāti skaidro ar selēna deficītu, kas nepieciešams GPx darbībai. Arī šai jautājumā dati ir pretrunīgi. Daļa autoru konstatē būtiski pazeminātu selēna līmeni astmas slimnieku asinīs [335, 475], turpretī citi- tikai nebūtiski mazinātu tā koncentrāciju [216], bet nemainītu selēna koncentrāciju trombocītos [475]. Citā pētījumā, kur salīdzināja divas nealerģiskas astmas slimnieku grupas un kur vienai no tām 14 nedēļas tika dots selēns, bet otrai placebo, novēroja būtisku selēna koncentrācijas pieaugumu serumā, GPx aktivitātes pieaugumu trombocītos, trombocītu agregācijas vājināšanos un klīnisku uzlabošanos, salīdzinājumā ar placebo grupu [217].

Atšķirībā no GPx aktivitātes tendences pazemināties astmas gadījumā cita antioksidatīvā enzīma Cu-Zn-SOD aktivitāte pieaug astmas slimnieku trombocītos. Gan alerģiskas, gan nealerģiskas astmas slimniekiem bija būtiski paaugstināta Cu-ZnSOD aktivitāte, un īpaši augsta tā bija alerģiskas astmas gadījumā [283]. Atšķirības Cu-Zn-SOD aktivitātē starp aspirīnpanesīgiem un aspirīnjutīgiem astmas slimniekiem nenovēroja [283]. Paaugstināto Cu-Zn-SOD aktivitāti, iespējams, var skaidrot ar kompensatorisku mehānismu vājinātai GPx aktivitātei un skābekļa radikāļu pastiprinātai izdalīšanai, lai gan šī antioksidatīvā aizsardzība ir nepietiekama. Šim oksidantu un antioksidantu līdzsvara traucējumam, iespējams, ir nozīme iekaisuma procesā astmas gadījumā [283], gan palielinot trombocītu agregācijas spēju un mediātoru izdalīšanos, gan veicinot oksidatīvā stresa attīstību apkārtējos audos. Par to liecina arī mazinātais trombocītu mūža ilgums astmas slimniekiem [491].

## 1.2. Hroniska obstruktīva plaušu slimība (HOPS): iekaisumšūnas un to aktivācijas un mijiedarbības mehānismi

HOPS raksturīg hronisks elpceļu, plaušu parenhīmas un asinsvadu iekaisums. Ieelpotās kaitīgās daļiņas un gāzes, kas sekmē HOPS izraisa plaušu iekaisumu attīstībai, kas savukārt rada audu destruktiju, vājina aizsardzības mehānismus un zmaina reparācijas mehānismus [296]. Bez tam HOPS patoģenēzē iesaistīts arī proteāžu un antiproteāžu līdzsvara traucējums plaušās un oksidatīvais stress [296]. Arī šie procesi var būt s iekaisuma seka, vai vides faktori, piemēram, oksidanti no cigarešu dūmiem, vai ģenētiski faktori, piemēram,  $\alpha_1$ - antitripsīna deficīts [296]. Plaušu audu bojājuma dēļ attīstās gļotu hipersekrecija elpceļos, to sašaurināšanās un fibroze, plaušu parenhīmas destruktija un plaušu asinsvadu pārmaiņas. Iekaisumā ir iesaistītas dažādas iekaisumšūnas, kuru skaits ir krietni palielināts [367], kā arī to izdalītie mediatori, proteāzes un oksidanti. HOPS raksturīgs palielināts neitrofilo leukocītu, makrofāgu, T limfocītu, kā arī mazākā mērā eozinofīlo leukocītu skaits plaušās [296]. Arī absolūtajam šūnu skaitam ir tendence būt palielinātam HOPS slimnieku grupā gan BAL, gan ierosinātās krēpās [497]. Šūnu skaita pieauguma pamatā ir pastiprināta šo šūnu piesaistīšana, palielināta izdzīvošana un aktivitāte [296].

### 1.2.1. Bronhu epitēlijšūnas

Tāpat kā astmas gadījumā, arī HOPS slimniekiem atklāj bronhu epitēlija bojājumus [367], lai gan ticamas atšķirības ierosināto un spontāno krēpu bronhu epitēlijšūnu skaitā starp veseliem nesmēķētājiem, veseliem smēķētājiem un HOPS slimniekiem nav novērotas [26, 182, 310, 469, 516]. Bronhu biopsiju materiālā no veseliem nesmēķētājiem, veseliem smēķētājiem un HOPS slimniekiem *in vitro* pēc iedarbības ar tabakas dūmiem bronhu epitēlija caurlaidība palielinās visiem, bet vislielākais efekts ir HOPS slimniekiem, turpretī mazākais efekts- smēķētājiem ar normālu plaušu funkciju [423]. Arī HOPS slimnieku ierosinātās krēpās ir būtiski palielināta albumīna koncentrācija salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem un veseliem smēķētājiem, kas norāda uz palielinātu bronhu asinsvadu endotēlija un bronhu epitēlija caurlaidību HOPS slimniekiem [516]. Arī veseliem smēķētājiem BAL šķidrumā ir palielināta albumīna koncentrācija salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [339]. Pie tam par bronhiālā un alveolārā epitēlija palielinātu caurlaidību veseliem smēķētājiem liecina arī saīsinātais tehnēcija ( $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA)

pusizskalošanās laiks, kas saīsinās vēl vairāk tūlīt pēc cigaretes izsmēķēšanas [339]. Bronhu biopsiju un rezekciju materiālos smēķētājiem bronhu epitēlijā ir būtiski palielināts kausšūnu skaits [145, 312, 413, 417, 501], īpaši HOPS slimniekiem [432], kas arī ir viens no palielinātas spontāno krēpu izdalīšanās cēloņiem smēķētājiem, īpaši HOPS slimniekiem [317].

Bronhu epitēlijam ir būtiska nozīme elpceļu antioksidatīvās aizsardzības nodrošināšanā. Bronhu biopsiju materiālā no veseliem nesmeķētājiem, veseliem smēķētājiem un HOPS slimniekiem *in vitro* bronhu epitēlija intracelulārā GSH līmenis ir būtiski paaugstināts paraugos no abām smēķētāju grupām- gan HOPS slimniekiem, gan veseliem smēķētājiem [423]. Iedarbojoties uz šiem paraugiem ar tabakas dūmiem, visās trīs paraugu grupās intracelulārā GSH līmenis būtiski pazeminājās, bet vislielākais GSH līmeņa pazeminājums tika novērots paraugos no HOPS slimniekiem [423], kas liecina par nepietiekamu antioksidatīvās aizsardzības sistēmu šai slimnieku grupai.

Bez elpceļu aizsargfunkcijas pret oksidantiem, elpceļu epitēlijšūnas arī pašas var izdalīt oksidantus. Pētījumos *in vitro* žurku trahejas epitēlijšūnas pēc tabakas dūmu iedarbības arī pašas apikālajā galā izdala  $H_2O_2$  un  $O_2^{\cdot-}$ , bet SOD pievienošana šo efektu nomāc [222].

Bez elpceļu aizsargfunkcijas elpceļu un alveolu epitēlijšūnas ir nozīmīgs iekaisuma mediatoru avots HOPS gadījumā [296]. Bronhu biopsijās HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem smēķētājiem ir būtiski palielināts MIP-1 $\alpha$  ekspresējošu epitēlijšūnu skaits, kas norāda uz palielinātu šā hemokīna sintēzi [129]. Bez tam šo MIP-1 $\alpha$  + epiteliocītu skaits apgriesti korelē ar FEV<sub>1</sub> [129]. Būtiski palielināta ICAM-1 ekspresija bazālajās bronhu epitēlijšūnās un E selektīna ekspresija bronhu asinsvadu endotēlijšūnās novērota tikai HOPS slimnieku bronhu biopsijās, atšķirībā no veseliem nesmeķētājiem, veseliem smēķētājiem un smēķētājiem ar hronisku bronhītu bez elpceļu obstrukcijas, kas norāda uz šo adhēzijas molekulu nozīmi iekaisumšūnu piesaistīšanā elpceļos HOPS slimniekiem [128]. HOPS slimnieku bronhu epitēlijšūnās novērota būtiski palielināta GM-CSF ekspresija salīdzinājumā ar veseliem nesmeķētājiem, bet mazāka nekā astmas slimniekiem [515].

Bronhu biopsiju materiālā no veseliem nesmeķētājiem, veseliem smēķētājiem un HOPS slimniekiem *in vitro* pēc tabakas dūmu iedarbības, HOPS slimnieku un veselu nesmeķētāju bronhu epitēlijs būtiski palielina tādu iekaisuma mediatoru kā IL-1 $\beta$  un šķīstošā ICAM-1 izdalīšanos, turpretī smēķētāju bez elpceļu obstrukcijas

bronhu epitēlijs būtiski nemaina šo molekulu sintēzi [423]. Pētījumos *in vitro* novērots, ka ar IL-1 $\beta$  un TNF $\alpha$  aktivētas bronhu epitēlijšūnas būtiski palielina IL-8 mRNS ekspresiju un IL-8 sintēzi [107, 285], kas ir spēcīgs hemotakses un aktivācijas faktors neitrofilēm un eozinofiliem leukocītiem [296]. Arī ar cigarešu dūmu ekstraktu stimulētu bronhu epitēlijšūnas būtiski palielina IL-8 izdalīšanu [332]. Tas norāda uz pastiprinātu HOPS slimnieku bronhu epitēlija jutīgumu pret tabakas dūmiem, kādēļ tas aktivējas, izdala citokīnus un ekspresē adhēzijas molekulas, piesaistot elpceļos neitrofilos un eozinofilos leukocītus. Turpretī veselu smēķētāju epitēlijšūnām raksturīga labāka aizsargspēja pret tabakas dūmu kaitīgo oksidatīvo ietekmi, par ko liecina visvājākā intracelulārā GSH koncentrācija HOPS slimnieku epitēlijšūnās salīdzinājumā ar veselu nesmēķētāju un veselu smēķētāju epitēlijšūnām pēc tabakas dūmu iedarbības [423]. Arī II tipa alveolocīti, stimulēti ar tabakas dūmu ekstraktu *in vitro*, stimulē monocītu un neitrofilo leukocītu hemotakses aktivitāti, izdalot citokīnus IL-8, G-CSF, MCP-1, LTB<sub>4</sub> un veicinot iekaisumu plaušās [323]. IL-8, iespējams, ir galvenā nozīme neitrofilo un eozinofilo leukocītu piesaistīšanā un aktivācijā HOPS slimnieku elpceļos [540] atšķirībā no astmas, kur iesaistīti citi mehānismi. Par to liecina arī pastiprinātā IL-8 koncentrācija HOPS slimnieku ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem un astmas slimniekiem [264, 540]. Arī veseliem smēķētājiem IL-8 koncentrācija ierosinātās krēpās ir lielāka nekā veseliem nesmēķētājiem, bet krietni mazāka nekā HOPS slimnieku grupai [264]. Bez bronhu epitēlija IL-8 sintezē arī aktivēti makrofāgi un neitrofilie leukocīti [326]. IL-8 sintēzi bronhu epitēlijšūnās un makrofāgos veicina TNF- $\alpha$ , aktivējot transkripcijas faktoru NF-kB, kas savukārt aktivē IL-8 gēna transkripciju [34]. Galvenie TNF- $\alpha$  avoti var būt makrofāgi [194], tuklās šūnas [193] un neitrofilie leukocīti [140]. Pētījumos ar dzīvniekiem un *in vitro*, iedarbojoties uz peļu plaušu epitēlijšūnām ar cietām daļiņām ar vidējo aerodinamisko diametru 2,5  $\mu$ m necitotoksiskā koncentrācijā, būtiski palielinās NF-kB atkarīgo gēnu (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL6, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ) mRNS transkripcijas aktivitāte, bet katalāze šo procesu inhibē [458]. Pie tam plaušu epitēlijšūnās novēroja būtisku oksidantu intracelulārās koncentrācijas palielināšanos pēc šo daļiņu iedarbības [458]. Šis pētījums norāda uz cietu daļiņu izraisītu oksidantatkarīgu NF-kB aktivāciju, kas izraisa iekaisuma citokīnu gēnu ekspresiju plaušu epitēlijšūnās [458].



Elpceļu epitēlijam, iespējams, ir būtiska nozīme elpceļu pārstrukturēšanā un fibrozes attīstībā HOPS slimniekiem, izdalot augšanas faktoros. Būtiski palielināta EGF sintēze konstatēta HOPS slimnieku bronhu epitēlijšūnās salīdzinājumā ar veselu nesmēķētāju bronhu epitēlijšūnām, tāpat, bet mazāka EGF sintēze bija arī astmas slimnieku bronhu epitēlijšūnās [515]. Būtiski palielināta TGF- $\beta$ 1 mRNS un paša proteīna sintēze tika atklāta bronheolu un alveolu epitēlijšūnās smēķējošiem un smēķēšanu pārtraukušiem HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar veselīgiem smēķētājiem [118]. Ticamu korelāciju novēro starp TGF- $\beta$  ekspresējošām bronhu epitēlijšūnām, bazālās membrānas biezumu un fibroblastu skaitu HOPS un astmas slimniekiem [515]. Bez tam būtiska korelācija HOPS un veselīgiem smēķētājiem kopā novērota starp TGF- $\beta$ 1 mRNS, kā arī paša proteīna sintēzi bronheolu epitēlijšūnās un FEV<sub>1</sub>, kā arī intraepiteliālo makrofāgu skaitu [118]. TGF- $\beta$ 1 receptori atrasti gan uz bronheolu epitēlijšūnām un gludajiem miocītiem, gan intraepiteliāliem makrofāgiem [118]. Pētījumā *in vitro* elpceļu epitēlijšūnas var izdalīt insulīnam līdzīgo augšanas faktoru, kas veicina fibroblastu proliferāciju un aktivāciju, sekmējot fibrozes attīstīšanos elpceļos un plaušu parenhīmā [75].

Epitēlijšūnām, iespējams, ir būtiska nozīme fibroblastu aktivācijā un proliferācijas veicināšanā, izdalot augšanas faktoros, piemēram, TGF- $\beta$ , kā arī makrofāgu, neitrofilo un eozinofilo leikocītu piesaistīšanā un aktivācijā elpceļos, izdalot IL-8, TGF- $\beta$  u.c. mediatoros. Rezultātā tiek veicināts iekaisums, fibroze un pārstrukturēšanās plaušās.

### 1.2.2. Neitrofilie leikocīti

Būtiski palielināts neitrofilo leikocītu relatīvais un absolūtais skaits konstatēts HOPS slimnieku ierosinātās krēpās [211, 264, 378, 425] un BAL šķidrumā [286, 318, 381, 497] salīdzinājumā ar veselīgiem smēķētājiem un veselīgiem nesmēķētājiem, lai gan ir arī atšķirīgi dati. Piemēram, Rutgers HOPS slimniekiem BAL šķidrumā un BW atklāj ļoti nelielu neitrofilo leikocītu relatīvo skaitu (BAL-1,7%, BW-5,5%) turpretī ierosinātās krēpās šis neitrofilo leikocītu skaits, tāpat kā iepriekš minētiem autoriem, ir būtiski palielināts (77,3%) [425]. Arī veselīgiem smēķētājiem atklāts būtiski palielināts neitrofilo leikocītu absolūtais un relatīvais skaits ierosinātās krēpās [264] un BAL šķidrumā [339, 420, 497] salīdzinājumā ar veselīgiem nesmēķētājiem, bet šī starpība ir mazāka. Arī smēķētājiem ar hronisku bronhītu bez elpceļu obstrukcijas atklāj būtiski palielinātu neitrofilo leikocītu skaitu BAL salīdzinājumā ar veselīgiem

nesmēķētājiem [286]. HOPS slimnieku ierosinātās krēpās ir palielināts neitrofilo leukocītu skaits arī salīdzinājumā ar astmas slimniekiem, kam savukārt tas ir lielāks salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [264]. Bez tam HOPS slimnieku grupā novērota ticama korelācija starp neitrofilo leukocītu relatīvo skaitu ierosinātās krēpās un elpceļu obstrukciju, ko raksturo  $FEV_1\%$  no normas [264, 378, 480]. Konstatēts, ka HOPS slimniekiem ar lielāku neitrofilo leukocītu relatīvo skaitu BAL šķidrums ir mazāka  $FEV_1$ ,  $FEV_1/FVC$ ,  $FEF_{25-75}$  un lielāka spontāno krēpu producēšana [497].

No bronhu sienas biopsijām iegūtie dati ir visai pretrunīgi: vieni autori neatrod būtiskas neitrofilo leukocītu skaita pārmaiņas bronhu gļotādā smēķējošiem hroniska bronhīta slimniekiem bez elpceļu obstrukcijas un HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [286], turpretī citi atklāj palielinātu neitrofilo leukocītu skaitu HOPS slimnieku bronhu gļotādas epitēlijā [382] un subepitēliālajā slānī [129]. Bez tam šīs atšķirības novērotas arī starp HOPS slimniekiem un smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas [129], kā arī atklāta būtiska apgriesta korelācija starp  $FEV_1$  un neitrofilo leukocītu skaitu [129]. Turpretī, kā novērots plaušu rezekcijas materiālā, HOPS slimnieku perifēriskajos bronhos nav būtiskas neitrofilo leukocītu skaita atšķirības salīdzinājumā ar veseliem smēķētājiem [430]. Smēķētājiem ar hronisku bronhītu salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem neitrofilo leukocītu skaits bronhu sienas bazālajā membrānā būtiski neatšķirās no veseliem nesmēķētājiem [427, 507].

BAL neitrofilo leukocītu skaita palielināšanās raksturīga HOPS paasinājuma gadījumā [25], arī astmas slimniekiem paasinājuma laikā palielinās neitrofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās [158].

Neitrofilo leukocītu aktivācijā un piesaistīšanā elpceļos, iespējams, nozīme ir citokīnam IL-8, ko izdala aktivēti makrofāgi, neitrofilie leukocīti un bronhu epitēlijšūnas [285, 326, 416]. Pētījumos *in vitro* veselu cilvēku asins neitrofilie leukocīti pēc aktivācijas ar  $LTB_4$  būtiski palielina IL-8 mRNS un IL-8 sintēzi un izdalīšanu [326]. Izmeklējot ierosinātās krēpas imūncitoloģiski, hroniska bronhīta slimniekiem galvenokārt dominē IL-8 pozitīvas šūnas, kas pārsvarā identificētas par neitrofilie leukocītiem, turpretī bronhiālās astmas slimniekiem dominē GM-CSF un IL-5 pozitīvas šūnas [230]. GM-CSF pozitīvas šūnas hroniska bronhīta gadījumā pārsvarā bija neitrofilie leukocīti un monocīti/makrofāgi, turpretī astmas gadījumā eozinofīlie leukocīti [230]. Atšķirībā no hroniska bronhīta astmas gadījumā IL-8 pozitīvas šūnas vairumā gadījumu bija monocīti/makrofāgi un epitēlijšūnas [230]. IL-8 līmenis bija būtiski paaugstināts HOPS slimnieku BAL salīdzinājumā ar veseliem

nesmēķētājiem [381] un ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem un veseliem smēķētājiem [264, 540]. IL-8 ticami korelē ar neitrofilo leukocītu absolūto skaitu un MPO koncentrāciju, kas norāda uz IL-8 nozīmi neitrofilo leukocītu hemotaksēs un aktivācijas gaitā [221, 381, 540]. Bez tam IL-8 koncentrācija ierosinātās krēpās ticami apgriesti korelē ar FEV<sub>1</sub>/FVC HOPS slimnieku grupā [540]. Arī veseliem smēķētājiem konstatēta būtiski palielināta IL-8 koncentrācija ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem, bet tā ir stipri mazāka nekā HOPS gadījumā, kas norāda uz iespējamo neitrofilo leukocītu piesaistīšanu bronhos jau ļoti agrīnā slimības stadijā [264]. Vēl viens būtisks hemotaksēs un aktivācijas faktors neitrofiliem leukocītiem ir LTB<sub>4</sub>. HOPS slimnieku ierosinātās krēpās LTB<sub>4</sub> līmenis ticami korelē ar MPO līmeni, kas norāda uz tā nozīmi neitrofilo leukocītu aktivācijā [221]. Bez tam *in vitro* arī nikotīns var darboties par hemotaksīnu neitrofiliem leukocītiem, kā arī potencēt citu hemotaksīnu darbību, piesaistot tos smēķētāju plaušās [503] un palielinot to izdzīvošanu, nomācot apoptozi [13]. Kā norāda Aošiba, šī apoptozes inhibīcija notiek, nikotīnam iedarbojoties uz neitrofilo leukocītu neholinērgiskiem receptoriem [13].

Neitrofilo leukocītu elastāze ir nozīmīgs elastīnu šķeļošs proteolītiskais enzīms, kas iesaistīts HOPS attīstībā, sagraujot plaušu elastīgo karkasu, palielinot gļotu sekrēciju un pasliktinot mukociliāro klīrensu [473].

Pētījumos *in vitro* HOPS slimnieku asins neitrofiliem leukocītiem ir pastiprināta proteolītiskā un hemotaktiskā aktivitāte salīdzinājumā ar veselu nesmēķētāju neitrofiliem leukocītiem [65]. Pētījumos *in vitro* neitrofilo leukocītu proteāzes-neitrofilo leukocītu elastāze, kolagenāze, neitrofilo leukocītu kathepsīns-G- jau vājā koncentrācijā izraisa spēcīgu epitēlija atslāņošanu no bronhu bazālās membrānas [330]. Pie tam neliela oksidantu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) klātie šo efektu palielina pat 10 reizes, kas norāda, ka proteāžu un oksidantu iedarbība ir sinerģiska [330]. Hroniska bronhīta un astmas slimniekiem ierosinātās krēpās atklāts būtiski palielināts gan kopējās, gan aktīvās elastāzes daudzums salīdzinājumā ar veseliem smēķētājiem un veseliem nesmēķētājiem, un tā korelē gan ar neitrofilo leukocītu relatīvo skaitu krēpās, gan apgriesti ar elpceļu obstrukciju (FEV<sub>1</sub>) [516]. HOPS slimnieku ierosinātās krēpās novērota arī paaugstināta HNL koncentrācija [265].

HOPS slimnieku salīdzinājumā ar veselu nesmēķētāju ierosinātās krēpās [265] un BAL [381] konstatēta būtiski palielināta MPO koncentrācija, kas norāda uz intensīvu brīvo radikāļu sintēzi aktivētos neitrofilos leukocītos HOPS slimniekiem. Arī

astmas gadījumā MPO ir palielinātā koncentrācijā ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem, bet HOPS slimniekiem MPO ir būtiski lielākā koncentrācijā nekā astmas slimniekiem [265]. Pētījumā *in vitro* jaunu smēķētāju neitrofilu leukocītiem ir būtiski lielāka MPO aktivitāte nekā līdzīga vecuma veseliem nesmēķētājiem [61]. MPO katalizē  $H_2O_2$  reakciju ar  $Cl^-$ , tāpēc veidojas HOCl (hipohlorskābe), kas ir ļoti spēcīgs oksidants [35, 209, 218]. Asimptomātisku smēķētāju asins neitrofilie leukocīti *in vitro*, izdala būtiski vairāk  $O_2^{\cdot-}$  (superoksīda radikāļus) nekā veselu nesmēķētāju neitrofilie leukocīti, pie tam aktivēti smēķētāju neitrofilie leukocīti kam palielināts perifērisko asins leukocītu skaits, izdala būtiski vairāk  $O_2^{\cdot-}$  nekā neitrofilie leukocīti no smēķētājiem ar normālu perifērisko asins leukocītu skaitu vai veselu nesmēķētāju neitrofilie leukocīti [311]. Pastāv ticama korelācija starp  $O_2^{\cdot-}$  izdalīšanos no aktivētiem asins neitrofilu leukocītiem un bronhu hiperreaktivitāti HOPS slimniekiem [396], pie tam  $O_2^{\cdot-}$  palielināta izdalīšanās no neitrofilu leukocītiem konstatēta HOPS paasinājuma laikā [404].

Arī pasīvā smēķēšana būtiski palielina neitrofilu leukocītu skaitu, hemotakses aktivitāti un oksidantu izdalīšanos salīdzinājumā ar pirms iedarbības līmeni [10].

### 1.2.3. Makrofāgi

HOPS slimnieku ierosinātās krēpās [264, 378] un BAL novērots mazināts makrofāgu relatīvais skaits salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem, kas ir uz neitrofilu leukocītu relatīvā skaita palielinājuma rēķina. Turpretī makrofāgu absolūtais skaits BAL [318] HOPS slimniekiem ir būtiski palielināts. Pie tam alveolārie makrofāgi HOPS slimniekiem bija vairāk aktivēti, saturēja vairāk pigmenta ieslēgumu citoplazmā. Palielinātā alveolāro makrofāgu pigmentācija bija būtiski saistīta ar pasliktinātu plaušu funkciju [480]. Arī veselu smēķētāju [267, 318, 339, 443] un smēķējošu astmas slimnieku grupā [267] BAL ir būtiski (divreiz) palielināts makrofāgu absolūtais skaits salīdzinājumā ar nesmēķētājiem.

Būtiski palielinātu makrofāgu (arī neitrofilu leukocītu un NK limfocītu) skaits bronhu biopsiju subepiteliālajā slānī konstatēts HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas [129, 425]. Pie tam visiem smēķētājiem kopā novērota ticama inversa korelācija starp  $FEV_1$  un makrofāgu (arī neitrofilu leukocītu un NK limfocītu) skaitu bronhu subepiteliālajā slānī [129]. Smēķētājiem ar hronisku bronhītu salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem novērots palielināts makrofāgu skaits bronhu sienas bazālajā membrānā [427, 507]. Turpretī plaušu rezekcijas

materiālā HOPS slimnieku perifēriskajos bronhos nav būtiskas atšķirības makrofāgu skaitā salīdzinājumā ar veseliem smēķētājiem [430].

Ar tabakas dūmiem aktivēti alveolārie makrofāgi izdala neitrofilo leukocītu hemotakses faktorus (IL-8). Atšķirībā no neitrofiliem leukocītiem, makrofāgiem nenovēro nikotīna hemotaksi [503]. Tas, iespējams, ir no tabakas dūmos esošā superoksīda atkarīgs process, kas ar NF- $\kappa$ B aktivācijas starpniecību palaiž IL-8 ekspresiju makrofāgos [356]. Pētījumos *in vitro* ar mikrodaļiņām vai šķiedrām aktivēti makrofāgi būtiski palielina IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 un TNF- $\alpha$  izdalīšanu un attiecīgo mRNS ekspresiju, veicinot plaušu audu iekaisumu un bojājuma attīstību [139]. Palielināta TNF- $\alpha$  izdalīšanās novērota arī no HOPS slimnieku asins monocītiem *in vitro*, kā arī plazmā [119]. Bez tam palielināta TNF- $\alpha$  koncentrācija novērota arī HOPS slimnieku ierosinātās krēpās un bronhu biopsijās [264], [341]. TNF- $\alpha$  aktivē transkripcijas faktoru NF- $\kappa$ B, kas savukārt aktivē IL-8 gēna transkripciju epitēlijšūnās un makrofāgos [34]. Izmeklējot ierosinātās krēpas imūncitoķīmiski, hroniska bronhīta slimniekiem pārsvarā dominē IL-8 pozitīvas šūnas, turpretī bronhiālās astmas slimniekiem- GM-CSF un IL-5 pozitīvas šūnas [230]. GM-CSF pozitīvas šūnas hroniska bronhīta gadījumā pārsvarā bija monocīti/makrofāgi un neitrofīlie leukocīti, turpretī astmas gadījumā eozinofīlie leukocīti [230]. Atšķirībā no hroniska bronhīta, kur IL-8 pozitīvas šūnas pārsvarā ir neitrofīlie leukocīti, astmas gadījumā IL-8 pozitīvas šūnas vairumā gadījumu bija monocīti/makrofāgi un epitēlijšūnas [230]. GM-CSF palielinātā koncentrācijā novērots BAL šķidrums HOPS slimniekiem un īpaši paasinājuma laikā [25]. GM-CSF paldzina neitrofilo leukocītu izdzīvošanu audos, un tam, iespējams, ir būtiska nozīme neitrofilā iekaisuma gadījumā HOPS slimniekiem [296]. Palielinātā koncentrācijā HOPS slimnieku ierosinātās krēpās novērots arī tāds spēcīgs neitrofilo leukocītu hemotakses faktors kā LTB<sub>4</sub> [221], par kura galveno avotu uzskata alveolāros makrofāgus [296]. Bez tam LTB<sub>4</sub>, iespējams, ir būtiska nozīme neitrofilo leukocītu izdzīvošanā audos. Pētījumos *in vitro*, iedarbojoties ar LTB<sub>4</sub> receptoru antagonistiem, būtiski mazinās aktivētu neitrofilo leukocītu izdzīvošana [292].

Arī TGF- $\beta$ 1 un tā receptori atrasti uz bronhiolu intraepitēliāliem makrofāgiem, alveolāriem makrofāgiem, bronhu epitēlijšūnām un bronhu gludiem miocītiem gan HOPS slimniekiem, gan veseliem smēķētājiem, pie tam intraepitēliālo makrofāgu skaits korelē ar bronhiolu epitēlijšūnu ekspresēto TGF- $\beta$ 1 mRNS un TGF- $\beta$ 1 proteīnu

abām smēķētāju grupām kopā, kas norāda, ka TGF- $\beta_1$  ir būtiska nozīme makrofāgu piesaistīšanai elpceļos HOPS slimniekiem [118].

Mononukleārie fagocīti spēj izdalīt daudz dažādu MMP, kas spēj sagraut elastīnu un citus plaušu audu ekstracelulārā karkasa sastāvdaļas un piedalīties HOPS attīstībā [452]. Piemēram, *in vitro* viens no visvairāk izdalītiem proteīniem ir 92-kD želatināze, kas arī pieder pie elastāzēm [452].

Pētījumos *in vitro* no jaunu smēķētāju BAL šķidruma iegūti alveolārie makrofāgi izdala būtiski vairāk  $O_2^{\cdot-}$  nekā no veseliem nesmēķētājiem iegūti makrofāgi [224, 351]. Pie tam vienlaikus ar pastiprināto  $O_2^{\cdot-}$  izdalīšanos novērota arī palielināta intracelulārā SOD aktivitāte alveolārajos makrofāgos, kas nodrošina pašas šūnas antioksidatīvās aizsardzības uzlabošanu [224]. Ar PAF stimulēti smēķētāju alveolārie makrofāgi izdala vairāk  $O_2^{\cdot-}$  nekā stimulēti nesmēķētāju alveolārie makrofāgi, kas liecina, ka smēķētāju alveolārie makrofāgi ir vairāk jutīgi pret PAF [442]. BAL šķidrumā smēķētājiem ir palielināta augsta blīvuma alveolāro makrofāgu subpopulācija, kam raksturīga palielināta  $O_2^{\cdot-}$  izdalīšana [443]. Bez tam smēķētāju BAL alveolārie makrofāgi *in vitro* izdala arī būtiski vairāk (līdz pat 2,5 reizes)  $H_2O_2$  nekā nesmēķētāju alveolārie makrofāgi [199, 235]. Pētījumā *in vitro* ar tabakas dūmiem eksponēti alveolārie makrofāgi palielina oksidantu izdalīšanu [137].

Gan veseliem smēķētājiem, gan smēķētājiem ar hronisku bronhītu BAL alveolārie makrofāgi un supernatants satur būtiski vairāk dzelzs nekā nesmēķētāju alveolārie makrofāgi un supernatants [498]. Pētījumā *in vitro* smēķētāju alveolārie makrofāgi arī izdala vairāk dzelzs nekā nesmēķētāju alveolārie makrofāgi [534]. Lai arī dzelzs avoti ir neskaidri, zināms, ka tabaka satur dzelzi (aptuveni 0,042  $\mu$ g cigaretē) [415]. Bez tam novērots, ka dzelzs uzkrājas laika gaitā vīriešiem, bet sievietēm tās strauja uzkrāšanās novērojama pēc menopauzes, kad parasti progresē HOPS [102].  $Fe^{2+}$  ir katalizators Hābera-Veisa reakcijā, kur no  $O_2^{\cdot-}$  un  $H_2O_2$ , savstarpēji reaģējot, veidojas  $\cdot OH$  (hidroksilradikālis) kas ir ļoti spēcīgs oksidants [35, 209, 218].

Būtiski palielinātu MMS-68 koncentrāciju novēro hroniska bronhīta un veselu smēķētāju BAL šķidrumā salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [470]. MMS-68 veicina gļotu sekrēciju no elpceļiem un respiratorajām epitēlijšūnām [470].

#### 1.2.4. Eozinofilie leukocīti

Ziņas par eozinofilo leukocītu klātieni un nozīmi HOPS gadījumā ir samērā neskaidras un pretrunīgas [296]. Ierosinātās krēpās [170, 211, 310, 425] un BAL šķidrums [381, 425] nealerģiskiem smēķējošiem HOPS slimniekiem ir būtiski palielināts eozinofilo leukocītu absolūtais un relatīvais skaits salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem. Turpretī citos pētījumos konstatēts tikai neliels nebūtiski palielināts eozinofilo leukocītu relatīvais skaits HOPS slimnieku ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [265]. Smēķējošiem HOPS slimniekiem stabilā fāzē ir būtiski paaugstināts eozinofilo un neitrofilo leukocītu un ECP līmenis ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [170, 310] un būtiski neatšķiras no astmas slimnieku grupas [310]. Perorālu glikokortikoīdu terapija būtiski mazina eozinofilo leukocītu skaitu un ECP līmeni krēpās, turpretī neitrofilo leukocītu skaitu tā nemaina [170]. Pie tam sākotnējais eozinofilo leukocītu skaits būtiski korelē ar elpceļu obstrukcijas reversibilitāti turpmākās ārstēšanas laikā ar glikokortikoīdiem. Tas norāda, ka eozinofilā iekaisuma komponente iesaistīta elpceļu obstrukcijas lēni reversiblaļā komponentē atšķirībā no neitrofilā iekaisuma komponentes HOPS gadījumā [170]. Turpretī ātri rversiblā obstrukcijas komponente (FEV<sub>1</sub> reversibilitāte salbutamolam), kā norāda Luī, HOPS slimniekiem ar pastiprinātu eozinofiliju (>3%) ierosinātās krēpās būtiski neatšķirās no HOPS slimniekiem ar pazeminātu eozinofiliju (≤3%) [310]. Luī pat iesaka no HOPS izdalīt atsevišķu fenotipu, ko nosauc par eozinofilo HOPS un kam raksturīgs tuklo šūnu un eozinofilais iekaisums, par ko liecina paaugstinātais tuklo šūnu triptāzes un eozinofilo leukocītu ECP līmenis ierosinātās krēpās eozinofilā HOPS slimniekiem, salīdzinot ar pārējiem HOPS slimniekiem [310].

Uz paaugstināto eozinofilo leukocītu skaitu norāda arī bronhu biopsijas materiāls. Smēķējošu hroniska bronhīta bez elpceļu obstrukcijas un HOPS slimnieku bronhu gļotādā ir palielināts eozinofilo leukocītu skaits salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [286, 382, 425], un tas būtiski neatšķiras no astmas slimnieku bronhu gļotādā reģistrēto leukocītu skaita. Tomēr atšķirībā no astmas slimniekiem HOPS un hroniska bronhīta slimnieku eozinofilie leukocīti nebija degranulējušies [286]. Citi autori tomēr norāda, ka eozinofilie leukocīti, iespējams, ir degranulējušies HOPS ierosinātās krēpās un tāpēc to ir mazāk skaitot gaismas mikroskopā [265]. Kā norāda Peši, palielināts eozinofilo leukocītu skaits HOPS slimniekiem ir bronhu gļotādas

bazālajā membrānā [382]. Turpretī Saeta konstatēja, ka smēķētājiem ar hronisku bronhītu eozinofilo leukocītu skaits bronhu sienas bazālajā membrānā būtiski neatšķiras no veseliem nesmēķētājiem [427].

Hroniska bronhīta paasinājuma laikā būtiski palielinās eozinofilo leukocītu (arī neitrofilo leukocītu un T limfocītu (CD3)) skaits bronhu biopsijā (30 reižu) un ierosinātās krēpās tāpat kā astmas gadījumā, turpretī IL-5 pozitīvo šūnu skaits palielinās novēro tikai astmas slimniekiem [428, 429]. Hroniska bronhīta paasinājuma un astmas gadījumā BAL un ierosināto krēpu eozinofilija korelē ar bronhu zemgļotādas eozinofilo leukocītu skaitu bronhu biopsijā [316].

Eozinofilo leukocītu aktivācijā un piesaistīšanā elpceļos, iespējams, ir nozīme IL-8, ko izdala aktivēti makrofāgi, neitrofilie leukocīti un bronhu epitēlijšūnas. IL-8 līmenis bija būtiski paaugstināts HOPS slimnieku BAL, un IL-8 ticami korelē ar eozinofilo leukocītu absolūto skaitu un ECP koncentrāciju, kas norāda uz IL-8 nozīmi eozinofilo leukocītu hemotaksē un aktivācijā [381]. Arī ierosinātās krēpās HOPS slimniekiem un veseliem smēķētājiem IL-8 līmenis bija būtiski paaugstināts, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, kā arī HOPS gadījumā augstāks nekā astmas slimniekiem, kam IL-8 līmenis neatšķīrās no veseliem nesmēķētājiem [264]. Tas norāda uz atšķirīgu mediatoru iesaistīšanos eozinofilo leukocītu piesaistīšanā elpceļos astmas (IL-3, IL-5 u.c.) un HOPS (IL-8) gadījumā.

Eozinofilie leukocīti, iespējams, ir iesaistīti pārstrukturēšanā un plaušu fibrozē HOPS slimniekiem, tāpat kā astmas gadījumā izdalot augšanas faktorus un veicinot fibroblastu proliferāciju un aktivāciju. HOPS slimnieku bronhu biopsijas subepitēliālajā slānī eozinofilos leukocītos ir būtiski pastiprināta TGF- $\beta$  sintēze, salīdzinot ar veselu nesmēķētāju eozinofiliem leukocītiem, bet tā ir mazāka nekā astmas slimnieku eozinofiliem leukocītiem [515]. Novērota arī ticama korelācija starp TGF- $\beta$  ekspresējošām šūnām (eozinofilie leukocīti, fibroblasti, epitēlijšūnas) un bazālās membrānas biezumu un fibroblastu skaitu HOPS un astmas slimniekiem [515].

Tāpat kā astmas slimniekiem, arī HOPS slimnieku ierosinātās krēpās ir palielināta ECP koncentrācija [265, 310, 425], un tā ir īpaši palielināta HOPS slimniekiem ar paaugstinātu eozinofilo leukocītu līmeni krēpās (eozinofilā HOPS gadījumā eozinofilie leukocīti >3%) [310]. Būtiski paaugstināts ECP līmenis ir arī nealergisku HOPS slimnieku BAL šķidrumā, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [381, 425]. ECP līmenis ticami korelē ar eozinofilo leukocītu absolūto skaitu, kas



norāda uz eozinofilo leukocītu aktivāciju [381]. Turpretī kā norāda Luī, kaut arī ECP līmenis ierosinātās krēpās ir paaugstināts eozinofilā HOPS slimniekiem un neatšķiras no astmas slimniekiem, ECP koncentrācija nekorelē ar eozinofilo leukocītu skaitu atšķirībā no astmas slimniekiem, kam novēroja ticamu korelāciju [310]. Šo fenomenu Luī skaidro ar dažādu eozinofilo leukocītu degranulācijas pakāpi, jo dažiem HOPS slimniekiem lielāka eozinofilo leukocītu skaita gadījumā bija zemāks ECP līmenis, bet citiem mazāka eozinofilo leukocītu skaita gadījumā bija lielāks ECP līmenis ierosinātās krēpās [310]. Turpretī Lakosts norāda, ka ECP līmenis BAL šķidrumā smēķējošiem HOPS un hroniska bronhīta slimniekiem atšķirībā no nesmēķējošiem astmas slimniekiem būtiski neatšķiras no veseliem nesmēķētājiem [286].

Tāpat kā astmas slimniekiem, arī HOPS slimnieku ierosinātās krēpās ir palielināta EPO koncentrācija [265]. Pētījumos *in vitro* ar PAF u.c. stimuliem aktivēti veselu cilvēku eozinofīlie leukocīti izdala stipri vairāk  $O_2^{\cdot-}$  nekā aktivēti neitrofilie leukocīti, kas savukārt izdala vairāk  $O_2^{\cdot-}$  nekā alveolārie makrofāgi [223, 314, 447, 554], kas liecina par eozinofilo leukocītu spēju arī mazāka šūnu skaita gadījumā dot nozīmīgu ieguldījumu oksidatīvā stresa attīstībā HOPS slimniekiem.

### 1.2.5. Limfocīti

Gan hroniska bronhīta, gan astmas slimnieku bronhu biopsijas materiālā limfocīti ir dominējošās infiltrētās šūnas bronhu zemgļotādā [316]. Plaušu rezekcijas materiālā HOPS slimniekiem ir būtiski palielināts CD8+ T limfocītu skaits, salīdzinot ar veseliem smēķētājiem, turpretī CD4+ T limfocītu skaits būtiski neatšķiras abām grupām [430]. Arī bronhu biopsijā subepiteliālajā slānī (pie epitēlija retikulārās bazālās membrānas) HOPS slimniekiem ir būtiski palielināts CD8 un CD3 pozitīvu T limfocītu skaits, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, turpretī B limfocītu skaits būtiski neatšķiras [369]. Pie tam novērota ticama negatīva korelācija starp CD8 pozitīvu T limfocītu skaitu un FEV<sub>1</sub>% (no normas) smēķētājiem ar hronisku bronhītu un HOPS slimniekiem [369]. Smēķētājiem ar hronisku bronhītu, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, ir palielināts aktivētu (IL-2 receptoru un VLA-1 pozitīvu) (CD3+) T limfocītu skaits bronhu sienas bazālajā membrānā, bet CD4 un CD8 T limfocītu relatīvā attiecība būtiski neatšķiras no veseliem nesmēķētājiem [427]. CD8 pozitīvu T limfocītu infiltrācija pulmonāro artēriju sienā ir būtiski paaugstināta gan vieglas HOPS slimniekiem, gan smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas, kas liecina par CD8+ T limfocītu iesaistīšanos plaušu iekaisumā jau agrīnā HOPS stadijā [377]. Kaut

arī CD8 pozitīvo T limfocītu nozīme HOPS iekaisumā vēl ir samērā neskaidra, tie var, piemēram, izraisīt alveolāro epiteliocītu citolīzi, un apoptozi izdalot perforīnu, granzīmu-B, kā arī TNF $\alpha$  [306]. Bez tam TNF- $\alpha$ , aktivējot transkripcijas faktoru NF- $\kappa$ B elpceļu epitēlijšūnās un makrofāgos, var izraisīt IL-8 gēna transkripciju un IL-8 sintēzi, kurš savukārt ir spēcīgs hemotaksīns neitrofilēm un eozinofiliem leukocītiem [34], tāpēc var attīstīties HOPS raksturīgais neitrofilais, kā arī eozinofila iekaisums.

Būtiski palielināts NK limfocītu skaits bronhu biopsijas subepiteliālajā slānī novērots HOPS slimniekiem, salīdzinot ar smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas [129]. Visiem smēķētājiem novērota ticama apgriesta korelācija starp FEV<sub>1</sub> un NK limfocītu skaitu bronhu subepiteliālajā slānī [129].

Ir arī ziņas par B limfocītu aktivāciju HOPS slimniekiem. Kā novērojis Peši, asins seruma IgE līmenis ticami korelē ar smēķēšanu HOPS slimniekiem [381].

### **1.2.6. Tuklās šūnas un bazofilie leukocīti**

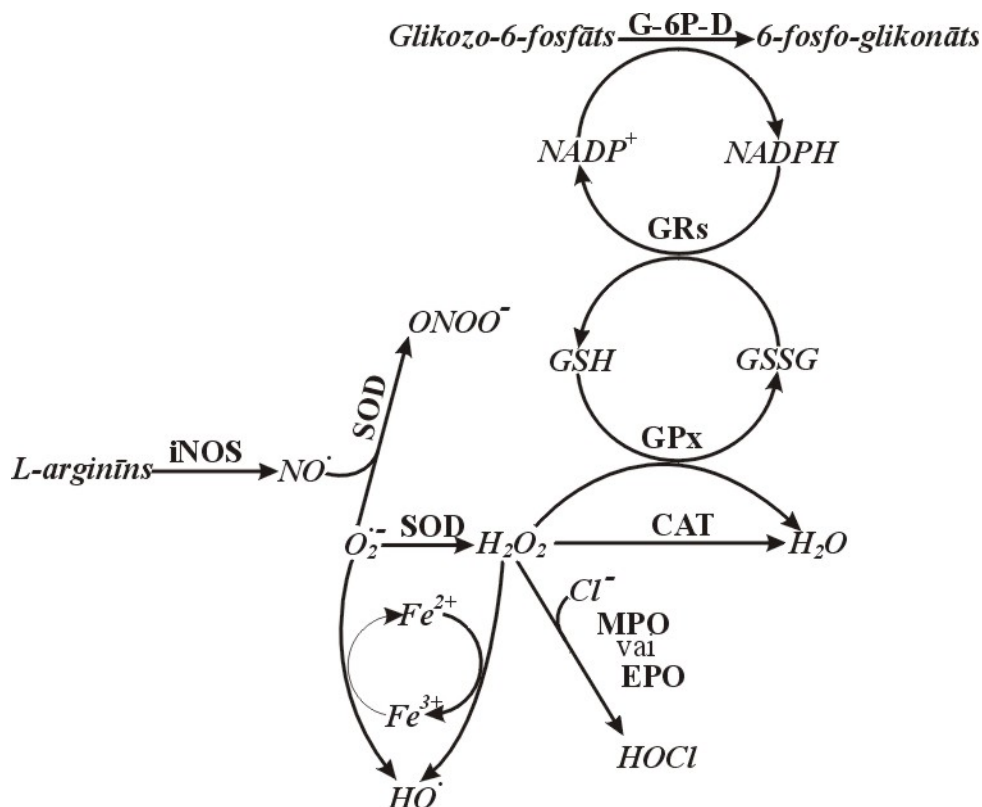
Smēķētājiem ar hronisku bronhītu, tuklo šūnu skaits bronhu sienas bazālajā membrānā būtiski neatšķiras no to skaita veseliem nesmēķētājiem [427]. Turpretī citā pētījumā HOPS slimniekiem ar pastiprinātu eozinofiliju ierosinātās krēpās (>3%) konstatēts būtiski paaugstināts triptāzes līmenis ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar HOPS slimniekiem ar vāju eozinofiliju ( $\leq$ 3%), kas norāda uz paaugstinātu tuklo šūnu aktivitāti [310]. Triptāze izraisa IL-8 sintēzi un ICAM-1 ekspresiju epitēlijšūnās, kas savukārt veicina granulocītu piesaistīšanu elpceļos [70].

### **1.2.7. Fibroblasti**

HOPS un astmas slimnieku bronhu subepiteliālā slāņa fibroblastiem ir būtiski palielināta TGF- $\beta$  sintēze salīdzinājumā ar fibroblastiem no veseliem nesmēķētājiem [515]. Novērota ticama korelācija starp TGF- $\beta$  ekspresējošām šūnām (eozinofīlie leukocīti, fibroblasti, epitēlijšūnas), bazālās membrānas biezumu un fibroblastu skaitu HOPS un astmas slimniekiem [515].

## **1.3. Oksidatīvais stress**

HOPS un bronhiālai astmai raksturīgs hronisks iekaisums un oksidantu un antioksidantu līdzsvara traucējums, kas ir galvenais šūnu bojājumu cēlonis [409]. 2. attēlā redzama oksidantu veidošanās un antioksidatīvās degradācijas shēma (modificēta [35, 209, 415] shēma).



## 2. attēls. Oksidantu veidošanās un to antioksidatīvā degradācija.

G-6P-D - glikozo-6-fosfāta dehidrogenāze,  $\text{NADP}^+$  un  $\text{NADPH}$  – nikotīnamīdadenīnnukleotīda fosfāta oksidētā un reducētā forma, GRs – glutaciona reduktāze, GPx – glutaciona peroksidāze, GSH un GSSG – glutaciona reducētā un oksidētā forma, SOD – superoksīda dismutāze, CAT – katalāze, iNOS – ierosināmā slāpekļa monoksīda sintāze, MPO - mieloperoksidāze, EPO – eozinofilo leukocītu peroksidāze,  $\text{NO}^\bullet$  - slāpekļa monoksīds,  $\text{ONOO}^-$  - peroksinitrīta anjons,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  - superoksīda anjons,  $\text{H}_2\text{O}_2$  – ūdeņraža peroksīds,  $\text{H}_2\text{O}$  – ūdens,  $\text{HO}^\bullet$  - hidroksilradikālis,  $\text{HOCl}$  – hipohlorskābe,  $\text{Cl}^-$  - hlora anjons,  $\text{Fe}^{2+}$  un  $\text{Fe}^{3+}$  - divvērtīgās un trīsvērtīgās dzelzs joni.

### 1.3.1. Oksidanti un to veidošanās

#### 1.3.1.1. Superoksīds

Pirmais solis oksidantu veidošanā ir **superoksīda** anjona ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) veidošanās no skābekļa ( $\text{O}_2$ ). Superoksīds ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) veidojas, ievadot vienu elektronu  $\pi$  saites irdinošajā orbitālē normālam molekulāram skābeklim. Nedaudz superoksīda veidojas normālā aerobiskā metabolismā, kā blakusprodukts enzimatiskā oksidēšanā mitohondrijos un mikrosomās [64]. Lielākā daudzumā (0,1-1,0  $\mu\text{M}$ ) superoksīds ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) lokāli tiek veidots respiratoriskā “uzliesmojuma” laikā [64] iekaisumašūnās (makrofāgos, eozinofilos, neitrofilos leukocītos) mitohondriju metabolismā, molibdēna hidrolāzes, ksantīnoksidāzes (XO), sulfītoksidāzes, aldehīdoksīdāzes reakcijās, arahidonskābes

metabolismā un NADPH oksidāzes atkarīgos procesos [35, 209]. Superoksīdu parasti uzskata par spēcīgu oksidantu ( $\Delta E^\circ = +0,94$ ) [64].

### 1.3.1.2. Hidroperoksilradikālis

Fizioloģiska pH apstākļos ūdensšķīdumā nedaudz mazāk kā 1% superoksīda var pastāvēt **hidroperoksilradikāļa** formā ( $\text{HOO}^\bullet$ ) [64]. Hidroperoksilradikālis ( $\Delta E^\circ = +1,44$ ) ir stiprāks oksidants par superoksīdu un, nebūdam ar lādiņu, var vieglāk iekļūt lipofilos apgabalos.  $\text{HOO}^\bullet$  var tieši atšķelt bis-alilisko ūdeņraža atomu no lipīda (LH) bez pārejas grupas metāla (piemēram, dzelzs) vai lipīda hidroperoksīda ( $\text{LOOH}$ ) palīdzības. Hidroperoksilradikālis ir viens no oksidantiem, kas var iniciēt lipīdu oksidāciju *in vivo* [64]. Kaut arī  $\text{HOO}^\bullet$  nedaudz veidojas lizosomās un fagosomās, tā koncentrācija ir pārāk vāja, lai būtiski ietekmētu lipīdu un lipoproteīnu oksidāciju *in vivo* [262].

### 1.3.1.3. Ūdeņraža peroksīds

Ūdeni saturošā vidē, pievienojoties otram elektronam pie superoksīda anjona ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), veidojas peroksīda anjons ( $\text{O}_2^{2-}$ ), kas, piesaistot protonus, veido **ūdeņraža peroksīdu** ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Būtiski daudz  $\text{H}_2\text{O}_2$  veidojas šūnu metabolismā, kā blakusprodukts ksantīna, glikozes, aldehīdu un D- aminoskābju oksidēšanā [64]. Normāli ūdeņraža peroksīds ir vājā koncentrācijā, ko nodrošina katalāze un glutaciona peroksidāze. Daudz  $\text{H}_2\text{O}_2$  var veidoties no superoksīda ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) dismutācijā, ko katalizē superoksīda dismutāze (SOD) [64]. Ūdeņraža peroksīda redukcijas un oksidācijas potenciāls ir par zemu ( $\Delta E^\circ = +0,32$ ), lai reaģētu ar nepiesātinātām alkilgrupām lipīdos [64].

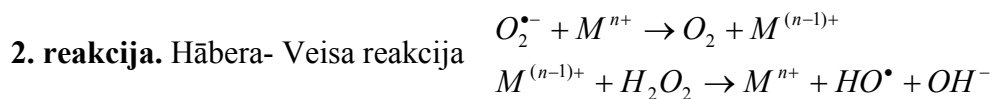
### 1.3.1.4. Hidroksilradikālis

Izmantojot elektronu spinu rezonances spektroskopiju (ESR) pierādīts, ka **hidroksilradikālis** ( $\text{HO}^\bullet$ ) veidojas no ūdeņraža peroksīda ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pārejas grupas metāla, piemēram, dzelzs jonu ( $\text{Fe}^{2+}$ ), klātienē Fentona reakcijā [64].

**1. reakcija.** Fentona reakcija:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{M}^{n+} \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{OH}^- + \text{M}^{(n+1)+}$

$\text{M}^{n+}$  un  $\text{M}^{(n+1)+}$  - metāla joni,  $\text{H}_2\text{O}_2$  - ūdeņraža peroksīds,  $\text{HO}^\bullet$  - hidroksilradikālis,  $\text{OH}^-$  - hidroksīda anjons.

Līdzīgi Hābera- Veisa reakcijā pārejas grupas metāla klātienē arī veidojas hidroksilradikālis ( $\text{HO}^\bullet$ ) no ūdeņraža peroksīda ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) un superoksīda ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ko arī uzskata par nozīmīgu mehānismu superoksīda izraisītu bojājumu veidošanā *in vivo* [19].



$M^{n+}$  un  $M^{(n-1)+}$  - metāla joni,  $O_2^{\bullet-}$  - superoksīda anjons,  $O_2$  – molekulārais skābeklis,  $H_2O_2$  – ūdeņraža peroksīds,  $HO^{\bullet}$  – hidroksilradikālis,  $OH^-$  - hidroksīda anjons.

Tā kā superoksīds ( $O_2^{\bullet-}$ ) *in vivo* sastopams samērā vājā koncentrācijā, drīzāk brīvā metāla jonus ( $M^{n+}$ ) var reducēt askorbīnskābe nekā ( $O_2^{\bullet-}$ ) [64]. Hidroksilradikālis ( $HO^{\bullet}$ ) ir ļoti stiprs oksidants ( $\Delta E^{\circ}_{pH7}=+2,31$ ), kas var reaģēt ar gandrīz jebkuru organisku molekulu, kura atrodas tā tuvumā, un šo procesu ierobežo tikai difūzija [64]. Metālu katalizēta ( $H_2O_2$ ) pārveidošana ir vieglākais veids radikāļu izraisītu reakciju ierosināšanai *in vitro*. Pie tam vara (I) sāļi katalizē šo reakciju ātrāk nekā dzelzs (II) [64]. Ir pretrunīgi dati par proteīnsaistītas dzelzs (feritīns, transferīns, laktoferīns u.c.) spēju veidot  $HO^{\bullet}$  no  $H_2O_2$  vai  $O_2^{\bullet-}$  [64]. Bez tam hidroksilradikālis ( $HO^{\bullet}$ ) nav selektīvs ūdeņraža atoma atšķēlētājs no alīliskas pozīcijas nepiesātināto lipīdu ķēdē. Ūdeņraža atoma atšķelšana no bisalīliskas pozīcijas lipīdos nav galvenais šīs reakcijas ceļš, bet tas notiek mazāk nekā 10% gadījumu [64]. Tā vietā biežāk novēro  $HO^{\bullet}$  pievienošanos alkilķēdei un lipīdu dubultsaites pārkārtošanos no cis uz trans orientāciju [64].

### 1.3.1.5. Pārejas gupas metāli

Uzskata, ka **pārejas grupas metāliem** vai to organiskiem kompleksiem ir galvenā nozīme oksidācijas iniciācijā *in vivo* [64]. Viens no tādiem metāliem ir **dzelzs**.  $Fe^{3+}$  ir pieci ārējie vairāk valenti elektroni,  $Fe^{2+}$ - seši valenti elektroni. Liganda piesaistīšana maina enerģijas līmeni, veidojot liganda lauka šķelumu. Atkarībā no liganda grupu ķīmiskā rakstura tās maina precīzu enerģijas sadalījumu šais elektronu orbitālēs, un šā lauka savijuma dēļ mainās metāla helāta kompleksa redukcijas un oksidācijas aktivitāte. [64]. Pārsvārā metālenzīmiem ir zems redukcijas un oksidācijas stāvoklis, un to metālu helāti var oksidēt tikai organisko substrātu ar zemu redukcijas un oksidācijas potenciālu, piemēram, flavīnu ( $E^0=-0,5-0V$ ), askorbīnskābi vai polifenolu ( $E^0=0-+0,5V$ ). Lipīdu peroksidācijas iniciācija, atšķēlot ūdeņraža atomu, var notikt reakcijās, kur redukcijas un oksidācijas potenciāls ir lielāks par +1V. To var sasniegt tikai tad, ja metāls veido kompleksu ar skābekli vai tā reaģētspējīgiem savienojumiem [19, 262], piemēram, Fentona reakcijas sistēmā sākumā veidojot  $H_2O_2$  un  $Fe^{2+}$  kompleksu. Šās reakcijas eksperimentālas modifikācijas ietver: helātoru izmantošanu, citu metālu, piemēram, varu, un

reducējošo vielu (piemēram, askorbāts vai tiols) izmantošanu, lai cikliski atgriestu metālu atpakaļ uz zemāku- reaģētspējīgu oksidācijas pakāpi [64]. Pierādīts, ka dažādi dzelzi saturoši proteīni, piemēram, hemoglobīns, mioglobīns, feritīns un citohromi, ir spējīgi iniciēt lipīdu peroksidāciju *in vitro* [64]. Piemēram,  $H_2O_2$  reaģējot ar hēma dzelzi, notiekot viena elektrona redukcijai, veidojas  $HO\cdot$  un ferilradikālis  $(Fe-OH)^{4+}$ , pie tam abi ir ar lielu oksidācijas spēju. Arī divu elektronu redukcija peroksīda skābekļa un skābekļa saitē var veidot  $(Fe=O)^{5+}$ , citus reaģētspējīgus oksidējošus un skābekļa pārnese savienojumus [64]. *In vitro*  $O_2^{\cdot-}$  var izdalīt feritīna saistīto dzelzi, reducējot no to no  $Fe^{3+}$  uz  $Fe^{2+}$  formu. Izdalītā dzelzs turpmāk var iesaistīties Fentona tipa reakcijās, tomēr feritīna tieksme noturēt dzelzi redukcijas un oksidācijas neaktīvā formā normālos apstākļos ir tik liela, ka tas cenšas izvākt brīvu dzelzi no šķidrums [64].

Reducēt un oksidēt aktīvi metāli un tos saturoši kompleksi viegli sekmē lipīdu hidroperoksīdu (LOOH) sadalīšanos par lipīdu alkoksil- ( $LO\cdot$ ), peroksilradikāli ( $LOO\cdot$ ), epoksīdiem u.c. produktiem [64].

**3. reakcija.**  $LOOH + M^{n+} \rightarrow LO\cdot + OH^- + M^{(n+1)+}$ .

**4. reakcija.**  $LOOH + M^{(n+1)+} \rightarrow LOO\cdot + H^+ + M^{n+}$ .

$M^{n+}$  un  $M^{(n+1)+}$  - metāla joni, LOOH - lipīda hidroperoksīds,  $LO\cdot$  - lipīda alkoksilradikālis,  $LOO\cdot$  - lipīda peroksilradikālis,  $OH^-$  - hidroksīda anjons,  $H^+$  - ūdeņraža katjons.

Audu bojājumu gadījumā, šis var būt nozīmīgākais hēma un citu metālu kompleksu izraisīts oksidācijas efekts, kas iniciē strauju oksidatīvo reakciju pašpavairošanos [177]. *In vivo* šo reakciju kopējo apjomu ierobežo reducēta metāla pieejamība. Ūdenī dzelzs pastāv  $Fe^{3+}$  un  $Fe^{2+}$  oksidācijas stāvoklī, un, tā kā brīvā veidā dzelzs ir ļoti vājā koncentrācijā, tā piedalās ķīmiskajās reakcijās šķīdumos tikai tad, ja tā ir šķīstošo ligandu kompleksos, piemēram, kompleksā ar askorbātu, citrātu ADP u.c. [64].

Būtiski palielināta dzelzs koncentrācija ir gan veseliem smēķētājiem, gan smēķētājiem ar hronisku bronhītu un gan intracelulāri alveolāros makrofāgos, gan ekstracelulāri BAL supernatantā, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [498]. Arī *in vitro* alveolārie makrofāgi smēķētājiem izdala vairāk dzelzs nekā nesmēķētājiem [534]. Palielinātā dzelzs daudzuma avoti smēķētāju plaušās ir neskaidri, bet ir zināma, ka katra cigarete satur ap 0,042  $\mu g$  dzelzs [415]. Bez tam dzelzs uzkrājas arī mūža laikā vīriešiem un īpaši postmenopauzē sievietēm [102]. Smēķējošām veselām

sievietēm līdz ar vecumu būtiski straujāk pieaug malondialdehīda (lipīdu peroksidācijas produkts) līmenis asinīs, salīdzinot ar smēķējošiem vīriešiem [60].

### 1.3.1.6. Mieloperoksidāze (MPO) un eozinofilo leukocītu peroksidāze (EPO)

Savukārt  $H_2O_2$  un hlora joni ( $Cl^-$ ) katalizēti ar neitrofilo leukocītu **mieloperoksidāzi** (MPO) vai **eozinofilo leukocītu peroksidāzi** (EPO) [512], veido **hipohlorskābi** (HOCl).  $\cdot OH$  un HOCl ir ļoti spēcīgi oksidanti, un  $H_2O_2$  tiek uzskatīts par galveno to sintēzes substrātu [35, 209, 218, 512]. Bez tam gan MPO, gan EPO var katalizēt arī tiocianāta oksidēšanos par spēcīgiem oksidantiem- hipotiocianātu u.c., kā arī katalizēt broma (Br) jonu reakciju ar  $H_2O_2$  veidojot **hipobromskābi** [512]. MPO veidotais tirozilradikālis var iniciēt LDL lipīdu peroksidāciju bez brīva metāla jonu klātienes [64].

HOPS slimniekiem atšķirībā no veseliem nesmēķētājiem ierosinātās krēpās [265] un BAL [381] ir būtiski palielināta neitrofilo leukocītu MPO koncentrācija. Arī astmas gadījumā MPO ir palielinātā koncentrācijā ierosinātās krēpās, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, bet HOPS slimniekiem MPO ir būtiski lielākā koncentrācijā nekā astmas slimniekiem [265]. HOPS slimnieku (bez  $\alpha_1$ -antitripsīna deficīta) MPO un asins proteīnu caurlaidība (krēpu/seruma albumīna attiecība) ierosinātās krēpās korelē negatīvi ar  $FEV_1\%$  [221], kas norāda uz HOCl nozīmi elpceļu pārstrukturēšanas veicināšanā [265]. Ar astmu slimiem bērniem arī novēro būtiski palielinātu brīvo radikāļu:  $O_2^{\cdot -}$  un  $\cdot OH$  koncentrāciju asins šūnās, salīdzinot, ar veseliem bērniem, un šo radikāļu koncentrācija negatīvi korelē ar PEF (maksimālo izelpas plūsmu) [451].

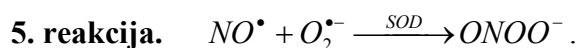
### 1.3.1.7. Ksantīnoksīdāze (XO)

**Ksantīnoksīdāze** (XO), kas veido  $O_2^{\cdot -}$  un  $H_2O_2$  no  $O_2$  novērota palielinātā koncentrācijā plaušās žurkām, kas eksponētas ar tabakas dūmiem [415]. XO aktivitāte arī bija būtiski palielināta un korelēja ar leukocītu adhēziju uz endotēlija ar tabakas dūmiem eksponētiem kāmjiem [294]. Palielināto XO koncentrāciju plaušās, iespējams, izraisīja ksantīndehidrogenāzes (XD) pārvēršanās par XO neitrofilo leukocītu elastāzes iedarbībā. *In vitro* aktivētu neitrofilo leukocītu izdalītā elastāze pārvērš XD par XO netālu esošās endotēlijšūnās [385]. Izmantojot elektronu paramagnētisko rezonansi ar 5,5-dimetil-1pirilīna slāpekļa oksīda elektronu spinu ķērāju un apgrieztas fāzes augstspiediena hromatogrāfiju, konstatētā XO produktu

aktivitāte HOPS slimnieku BAL supernatantā ir būtiski lielāka nekā veseliem nesmēķētājiem. Tas norāda uz XO līdzdalību superoksīda ekstracelulārā veidošanā BAL supernatantā un arī elpceļus klājošā šķidrums [389]. Bez tam būtiska nozīme oksidantu pastiprinātā sintēzē ir XO HOPS slimniekiem slodzes laikā [219]. Pie tam šī  $O_2^{\cdot-}$  veidošana saistīta ar DNS bojājumiem un urīnskābes veidošanos [388]. Veseliem smēķētājiem ir būtiski palielināta BAL leikocītu izdalītā superoksīda koncentrācija, salīdzinot ar nesmēķētājiem, un īpaši tā ir palielināta stundu pēc smēķēšanas. Tas sakrīt ar akūtu epitēlija caurlaidības palielināšanos (noteikta ar  $^{99m}Tc$ -DTPA klīrensu) un neitrofilo leikocītu skaita pieaugumu BAL [339]. Pētījumos ar dzīvniekiem  $H_2O_2$  inhalācija būtiski palielina elpceļu asinsvadu caurlaidību, kas liecina par tā izraisītu plaušu iekaisumu [333]. HOPS slimniekiem ir būtiski palielināts izelpotā  $H_2O_2$  daudzums, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, kas ir īpaši palielināts paasinājuma laikā. Tam cēlonis, iespējams, ir XO aktivitāte [122]. Arī astmas slimnieku izelpas gaisā ir būtiski palielināts  $H_2O_2$  daudzums [229]. Bez tam pētījumos ar dzīvniekiem konstatēts, ka XO sintezētie oksidanti var izraisīt lipīdu mediatoru izdalīšanos no granulocītiem, palielinot bronhu reaktivitāti [291], kā arī elpceļu asinsvadu caurlaidību, kas izraisa iekaisumu un tūsku [334].

### 1.3.1.8. Slāpekļa monoksīds

Būtiski palielināta **slāpekļa monoksīda** ( $NO^{\bullet}$ ) koncentrācija izelpas gaisā novērota astmas [33, 229] un HOPS slimniekiem, īpaši paasinājuma laikā [325]. Sintezēts palielinātā daudzumā,  $NO^{\bullet}$  var darboties ne tikai par mediatoru, izraisot bronhu dilatāciju, vazodilatāciju un hiperēmiju, plazmas eksudāciju, gļotu hipersekrēciju [32], bet arī citotoksiski, reaģējot ar superoksīdu veidojas peroksinitrīts- spēcīgs oksidants [435]. Iekaisumā galvenā nozīme  $NO^{\bullet}$  sintēzē ir iNOS (inducējamai  $NO^{\bullet}$  sintāzei) kas no L arginīna sintezē  $NO^{\bullet}$  skābekļatkarīgā 5. elektrona oksidācijas reakcijā [64].  $NO^{\bullet}$  tāpat kā superoksīds ( $O_2^{\cdot-}$ ) ir vājš oksidants (pats par sevi nespēj oksidēt lipīdus). Slāpekļa monoksīda bioloģisko aktivitāti palielina superoksīda dismutāze (SOD), kas katalizē reakciju starp  $NO^{\bullet}$  un  $O_2^{\cdot-}$ , veidojot peroksinitrīta anjonu ( $ONOO^-$ ) [64].



$NO^{\bullet}$  - slāpekļa monoksīds,  $O_2^{\cdot-}$  - superoksīda anjons,  $ONOO^-$  - peroksinitrīta anjons, SOD – superoksīda dismutāze.



ONOO<sup>-</sup> var iniciēt lipīdu peroksidāciju, kaut arī precīza oksidantu identifikācija, kas iesaistās šais procesos, vēl ir neskaidra [64]. Peroksinitrīti sadalās par HO<sup>•</sup> un NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, kas katrs var iniciēt lipīdu peroksidāciju [64].

**6. reakcija.**  $ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH \rightarrow NO_2^\bullet + HO^\bullet$ .

ONOO<sup>-</sup> - peroksinitrīta anjons, H<sup>+</sup> - ūdeņraža katjons, ONOOH – slāpekļskābe, NO<sub>2</sub><sup>•</sup> - slāpekļa dioksīds, HO<sup>•</sup> - hidroksilradikālis.

Tā kā bioloģiskās sistēmās NO<sup>•</sup> un O<sub>2</sub><sup>•-</sup> koncentrācija ir samērā vāja un tie dzīvo īsu brīdi, šo molekulu savstarpējās reakcijas iespējamība ir samērā neliela, izņemot tajās šūnās vietās, kur šīs vielas tiek sintezētas. Pie tam NO<sup>•</sup>, reaģējot ar citiem radikāļiem, var derēt par pašvairošanās lipīdu peroksilradikāļu (LOO<sup>•</sup>) aizvācēju no lipīdu peroksidācijas reakciju cikla [64].

**7. reakcija.**  $LOO^\bullet + NO^\bullet \rightarrow LOONO$

LOO<sup>•</sup> - lipīda peroksilradikālis, NO<sup>•</sup> - slāpekļa monoksīds, LOONO – lipīda nitrāts.

Izveidotais LOONO var savukārt sadalīties par lipīda alkoksilradikāli (LO<sup>•</sup>) [64].

**8. reakcija.**  $LOONO \rightarrow LO^\bullet + NO_2^\bullet$

LO<sup>•</sup> - lipīda alkoksilradikālis, NO<sub>2</sub><sup>•</sup> - slāpekļa dioksīds.

Tomēr dati ir pretrunīgi. Makrofāgos *in vitro* novērots, ka vienlaicīga NO<sup>•</sup> un O<sub>2</sub><sup>•-</sup> izdalīšanas veicināšana drīzāk inhibē nekā veicina zema blīvuma lipoproteīnu (LDL) oksidāciju [64]. Turpretī eozinofilos leukocītus uzskata par vienu no galvenajiem NO<sup>•</sup> izcelsmes oksidantu NO<sup>2-</sup>, NO<sup>3-</sup> avotiem smagas astmas gadījumā, un, iespējams, EPO (eozinofilo leukocītu peroksidāze) ir enzimatisks nitrēšanas starpnieks [315, 538].

Iekaisuma citokīnu un oksidantu ietekmē aktivētas bronhu epitēlijšūnas, makrofāgi un eozinofīlie leukocīti ar transkripcijas faktora NF-kB starpniecību [32] var palielināt iNOS mRNS ekspresiju un sintēzītāpēc arī palielinās NO<sup>•</sup> sintēze un koncentrācija izelpas gaisā [33, 123, 240, 435, 524, 543, 548].

### 1.3.1.9. Tabakas dūmi

**Tabakas dūmi** ir bagātīgs oksidantu avots [48, 91, 402]. To radikāļi ir pietiekami stabili, lai tos noteiktu ar elektronu spinu paramagnētisko rezonansi [401]. Tabakas dūmu darvas komponente satur nesapārotus elektronus 10<sup>18</sup> spinu/gramu darvas. Viens no šiem radikāļiem ir hinona-hidrohinona redukcijas un oksidācijas komplekss, kas reducē O<sub>2</sub> par O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [90, 549]. Tabakas dūmu gāzes komponente satur vairāk nekā 1x10<sup>16</sup> organisko radikāļu vienā cigaretē [401]. Tie ir ļoti aktīvi īslaicīgi

dzīvojoši <1 s oglekļa un slāpekļa radikāļi. Bez tam gāzes fāze satur arī tādus aktīvus reaģētspējīgus savienojumus kā alkēnus un diēnus [401]. Tabakas dūmi satur arī vairāk nekā 500 ppm NO [149], kas savukārt var oksidēties par NO<sub>2</sub> [401]. NO<sup>•</sup> un NO<sub>2</sub> reaģējot ar alkēniem un diēniem, veidojas organiskie radikāļi [401]. Kā noskaidrots pētījumos ar dzīvniekiem, tabakas dūmi palielina NO<sup>•</sup> sintēzi plaušās [539]. NO<sup>•</sup> un O<sub>2</sub><sup>-</sup>, savstarpēji reaģējot, var veidot peroksinitrātus [209].

*In vitro*, eksponējot asins plazmu ar gāzes fāzes tabakas dūmiem, novēro gan lipīdu peroksidāciju, gan proteīnu oksidāciju, un endogeniskā askorbīnskābe aizsargā pret lipīdu, bet ne proteīnu oksidāciju [108]. Turpretī pievienots GSH aizsargā pret proteīnu, bet ne lipīdu peroksidāciju [108]. Skābekļa radikāļi palielina tabakas dūmu nitrozamīnu izraisītos DNS bojājumus, turpretī SOD un CAT pievienošana būtiski mazina DNS bojājumus *in vitro* [530]. Bez tam, kā novērots *in vitro*, tabakas dūmos esošo skābekļa radikāļu ietekmē mazinās neitrofilo leukocītu deformētspēja, ietekmējot to citoskeletu, kā arī palielinās brīvo radikāļu izdalīšanās no pašiem neitrofiliem leukocītiem [138], kas, iespējams, ir viens no iemesliem, kāpēc neitrofilie leukocīti uzkrājas smēķētāju elpceļos. Pētījumos ar dzīvniekiem ar O<sub>2</sub><sup>-</sup> eksponēta asins plazmas intradermāla injekcija izraisa spēcīgu neitrofilo leukocītu infiltrāciju, un šo efektu inhibē SOD, bet ne CAT [383]. Tas norāda, ka, superoksīdam reaģējot ar plazmas komponentiem, veidojas spēcīgs hemotaksīns neitrofiliem leukocītiem [383]. Smēķētāju BAL šķidrums leukocīti izdala būtiski vairāk O<sub>2</sub><sup>-</sup> nekā nesmēķētāju leukocīti, un īpaši palielināta O<sub>2</sub><sup>-</sup> koncentrācija novērota 1 h pēc smēķēšanas [339]. Smēķētāju plazmā ir būtiski palielināta TBARS (tiobarbītskābes reaktīvie savienojumi) koncentrācija, kas norāda uz pastiprinātu lipīdu peroksidāciju [339].

Bez tam, oksidantiem oksidējot lipīdus, var veidoties prostaglandīnu analogi, piemēram, 8-izo-PGF<sub>2α</sub>, kas pastiprina iekaisumreakciju. Astmas slimniekiem ir būtiski palielināta 8-izo-PGF<sub>2α</sub> koncentrācija plazmā, salīdzinot ar veseliem brīvprātīgiem, un ticama korelācija ar astmas simptomu smagumu [536]. Ar oksidantu starpniecību var notikt arī cietu daļiņu izraisīta oksidant-atkarīgu NF-kB aktivācija, kas izraisa iekaisuma citokīnu gēnu ekspresiju plaušu epitēlijšūnās [458].

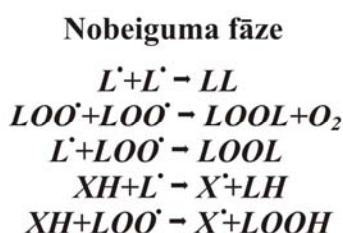
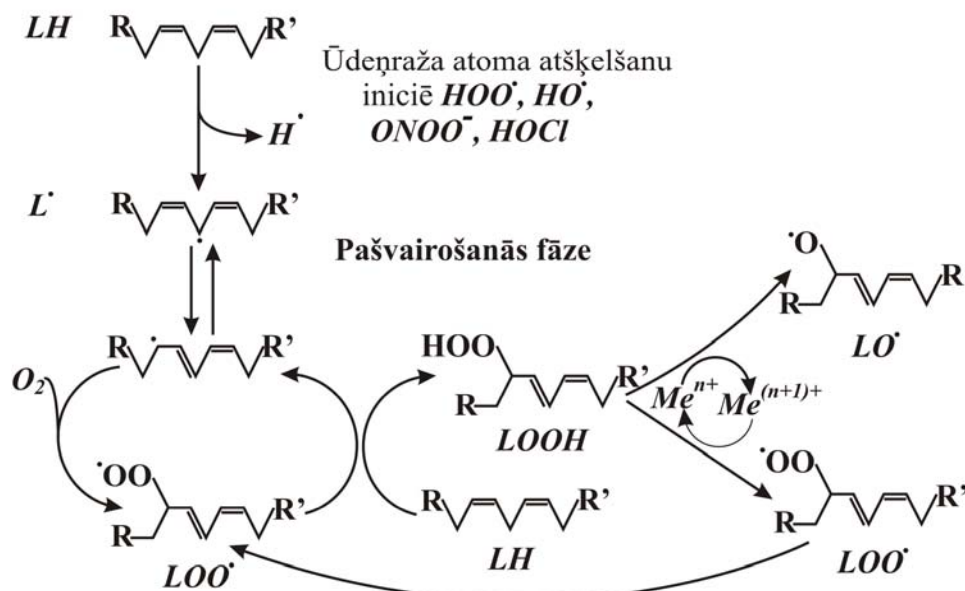
### 1.3.2. Lipīdu peroksidācijas ķēdes reakcija

Aktīvi reaģētspējīgie skābekļa radikāļi (hidroksilradikālis u.c.), reaģējot ar polinepiesātinātajām taukskābēm un zema blīvuma lipoproteīniem, uz lipīdu membrānas izraisa pašpastiprinātu ķēdes reakciju, kur tikai dažu lipīdu molekulu

sākotnēja oksidēšana var izraisīt plašus šūnu bojājumus [64, 346]. Parasti par lipīdu peroksidāciju runā, lai aprakstītu nefermentatīvu oksidatīvu lipīdu degradāciju [64].

Lipīdu peroksidācija sastāv no trim fāzēm: iniciācijas fāzes, pašvairošanās fāzes un nobeiguma fāzes (sk. 3. att.) [64, 134, 187, 262].

### Iniciācijas fāze



**3. attēls** Divnepiesātināto lipīdu peroksidācijas ķēdes reakcijas trīs fāzes. LH - lipīds,  $L\cdot$  - lipīda (oglekļa centrēts) radikālis, LOOH - lipīda hidroperoksīds,  $LOO\cdot$  - lipīda peroksilradikālis,  $LO\cdot$  - lipīda alkoksilradikālis,  $X\cdot$  - pašvairošanos pārtraucošais radikālis,  $O_2$  - molekulārais skābeklis,  $Me^{n+}$  un  $Me^{(n+1)+}$  - pārejas grupas metāla joni (modificēta [64] shēma).

#### 1.3.2.1. Iniciācijas fāze

**Iniciācija** ir vismazāk izpētītais lipīdu peroksidācijas solis [64]. Iniciācijas pirmais solis ir tad, kad oksidants ar pietiekami stipru ķīmisko reaģētspēju atņem ūdeņraža atomu no lipīdu (LH) alkilķēdes, veidojot lipīda radikāli ( $L\cdot$ ). Lipīda oksidējamība atkarīga no viegluma, ar kādu sākumā ūdeņraža atoms var tikt atšķelts. Polinepiesātināto taukskābju ķēdes, piemēram, linolēnskābes (18:3) un linolejskābes (18:2), ir jutīgākas pret oksidāciju kā viennepiesātinātās taukskābes, piemēram, oleīnskābe (18:1), jo bisalīliskā metilēna C-H saite (75 kcal/M) ir vājāka, salīdzinot ar

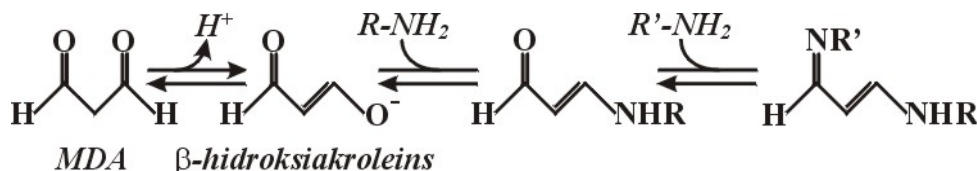
monoalīlisko metilēna C-H saiti (88 kcal/M) [64, 177]. Pats par sevi molekulārais skābeklis ir vāji reaģētspējīgs un ir oksidants šūnu bioloģijā tikai ar fermentu palīdzību [64]. Tāpat, kā molekulārais skābeklis ( $O_2$ ) ūdeņraža peroksīds ( $H_2O_2$ ) ( $\Delta E^\circ = +0,32$ ), superoksīds ( $O_2^{\cdot -}$ ) ( $\Delta E^\circ = +0,94$ ) un slāpekļa monoksīds ( $NO^{\cdot}$ ) viens pats nevar iniciēt lipīdu peroksidāciju. Lai iniciētu lipīdu peroksidāciju atšķelot ūdeņraža atomu, nepieciešams, lai vielas redukcijas un oksidācijas potenciāls būtu lielāks par  $\Delta E^\circ = +1V$  [64]. Tāpēc lipīdu peroksidāciju tieši (bez starpreakcijām un katalizatoriem) var iniciēt tādi oksidanti kā hidroperoksilradikālis ( $HOO^{\cdot}$ ) ( $\Delta E^\circ = +1,44$ ), hidroksilradikālis ( $HO^{\cdot}$ ) ( $\Delta E^\circ = +2,31$ ), peroksinitrīts ( $ONOO^{\cdot}$ ) [64] un hipohloroskābe ( $HOCl$ ) [415]. Kad alkilradikālis ( $L^{\cdot}$ ) izveidojies, blakusesošās olfīngrupas (jebkurš loceklis alkingrupā) nodrošina rezonanses stabilizāciju un polinepiesātināto grupu gadījumā veido raksturīgo ciklopentadiēnradikāli. Molekulārā skābekļa klātienē skābeklis var tikt viegli piesaistīts, veidojot peroksilradikāli ( $LOO^{\cdot}$ ). Ja skābekļa parciālais spiediens pārsniedz 100 mm Hg, šās pievienošanās reakcijas ātrums atkarīgs tikai no difūzijas ( $K \approx 109M^{-1}s^{-1}$ ) [64, 134, 177, 262].

### 1.3.2.2. Pašvairošanās fāze

Peroksilradikālis ( $LOO^{\cdot}$ ) ir būtisks **pašvairošanās** starpnieks, jo, reiz izveidojies, tas var turpināt oksidatīvo ķēdes reakciju, atdalot ūdeņraža atomu no tuvumā esošām alkilgrupām (sk. 3.att.). Šīs pašvairošanās reakcijas cikls atkārtojas vairākkārt ar ūdeņraža atšķelšanu un  $LOO^{\cdot}$  veidošanos ar nosacījumu, ka pieejams pietiekami daudz substrāta:  $O_2$  un LH, un konkurējošās nobeiguma reakcijas nav būtiski izsmēlušas radikāļu pašvairošanās sistēmu [64]. Kā iepriekš minēts, pārnēsējmetāli izraisa radikāļu reakcijas, kurās tiek izmantots iepriekš veidots lipīdu hidroperoksīds ( $LOOH$ ) (sk. 3. un 4. reakcija) un radīti daudz reaģētspējīgāki lipīdu alkil - ( $LO^{\cdot}$ ) un peroksilradikāļi ( $LOO^{\cdot}$ ). Ar reiz izveidotiem alkil - ( $LO^{\cdot}$ ) un peroksilradikāļiem ( $LOO^{\cdot}$ ) var notikt arī plašas kompleksēšanās, fragmentēšanās, ciklēšanas un  $\beta$  pāriešanas reakcijas, kā rezultātā var veidoties daudz mazmolekulāri produkti, kam variē skābekļa atrašanās un dubultsaišu vieta. Gan ar alkoksil - ( $LO^{\cdot}$ ), gan peroksilradikāļiem ( $LOO^{\cdot}$ ) notiek izomerizācijas un skābekļa apmaiņas reakcijas, kurās veidojas vēl citi pašvairojoši savienojumi, kas spēj atšķelt bisalīlisko ūdeņradi. Starp peroksidatīvās lipīdu sadalīšanās produktiem ir dažādi  $\alpha$  un  $\beta$  nepiesātinātie

aldehīdi, piemēram, 4-hidroksialkenāls, malondialdehīds (MDA) kas var saistīties ar amino - vai tiolgrupām [64].

MDA var reaģēt ar nukleofilajiem amīniem un sulfurgrupām (R-SH), veidojot rezonanses stabilizētus produktus. Tāpat MDA var reaģēt ar primārajām aminogrupām (R-NH<sub>2</sub>), piemēram, aminoskābēs, veidojot R-NH-CH=CH-CH=O radniecīgas struktūras (sk. 4. att.) [64].



**4. attēls Vien- un div-aizstāta malondialdehīda un aminoskābju savienojumu veidošanās.** MDA – malondialdehīds, R-NH<sub>2</sub> un R'-NH<sub>2</sub> – aminoskābes u.c. amīni.

Pie tam MDA vieglāk modificē proteīnus nekā brīvās aminoskābes [64].

Ja lipīdu peroksidācija sākusies, veidojas daudz dažādi mazmolekulāri sadalīšanās produkti, kas bieži ir ļoti reaģētspējīgi un, reaģējot ar nozīmīgām šūnu molekulām, izraisa to bojājumus, kas manifestējas par patoloģiskām pārmaiņām [64].

### 1.3.2.3. Nobeiguma fāze

Galū galā peroksilradikāļu pašvairošanās reakcijas var tikt pārtrauktas ar dažādām konkurējošām **nobeiguma** reakcijām. Tā, piemēram, reakcijā starp diviem alkilradikāļiem (L<sup>•</sup>) vai diviem peroksilradikāļiem (LOO<sup>•</sup>) veidojas neradikāli produkti. Šis pēdējais mehānisms (Rasela terminācijas reakcija) notiek ar tetraoksīda (LOO-OOL) starposma veidošanos, un to veicina paaugstināts skābekļa parciālais spiediens [64]. *In vivo*, kur ir bagātīga antioksidantu vide, terminācijas reakcijās iesaistās lipīdu radikāļi ar dažādiem nepeptīdu substrātiem [64].

Būtiski palielināts MDA (lipīdu peroksidācijas produkts) līmenis asinīs novērots veselām smēķētājiem atšķirībā no veselām nesmēķētājiem, bet tā līmenim nav būtiska sakara ar vecumu vīriešiem un nesmēķējošām sievietēm, turpretī smēķējošām veselām sievietēm tā līmenis asinīs pieaug līdz ar vecumu [60]. Plaušu rezekcijas materiāla pētījumos smēķētājiem bez plaušu audzēja, (līdzīgi rezultāti arī cilvēkiem ar plaušu audzēju, materiāls ņemts audzēja neskartā apvidū) ar dažādu elpceļu obstrukcijas pakāpi, MEF<sub>75</sub> bija būtiski mazāks pacientiem ar lielu MDA koncentrāciju plaušu audos, kas norāda, ka brīvo radikāļu izraisītā lipīdu peroksidācija saistīta ar mazo elpceļu obstrukciju [384]. Pie kam MDA koncentrācija audos bija lielāka smēķējošiem nekā nesen smēķēt pārtraukušiem pacientiem, un MDA

koncentrācija audos būtiski negatīvi korelēja ar dienu skaitu no smēķēšanas pārtraukšanas [384]. Veseliem smēķētājiem novēroja arī būtiski palielinātu pentāna koncentrāciju (raksturo lipīdu peroksidāciju) izelpas gaisā salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [231].

### 1.3.3. Antioksidatīvās aizsardzības sistēma

Plaušās ir spēcīgi attīstīta antioksidatīvā sistēma, ko var iedalīt enzimatiskajā un neenzimatiskajā sistēmā [209, 218]. Enzimātie antioksidanti, piemēram, SOD (superoksīda dismutāze), GPx (glutaciona peroksidāze) un CAT (katalāze), ierobežo peroksīdu koncentrāciju un darbojas, lai mazinātu lipīdu peroksidācijas iniciācijas savienojumu pieejamību [64]. SOD katalizē  $O_2^{\cdot-}$  (superoksīda anjonu) pārvēršanos par  $H_2O_2$ , CAT  $H_2O_2$  pārvērš par  $H_2O$ , un glutaciona redukcijas un oksidācijas sistēma inaktivē  $H_2O_2$ , pārvēršot to par  $H_2O$ . Galvenā nozīme varētu būt trīs veidu SOD: Mn SOD, kas atrodas mitohondrijos, Cu-Zn SOD, kas atrodas šūnu citoplazmā, un ekstracelulārā SOD, kas klāj asinsvadus un bronhus [415]. Glutaciona redukcijas un oksidācijas sistēmā nozīmīga sastāvdaļa ir glutations, kas sastopams gan reducētā GSH, gan oksidētā GSSG formā, kur oksidējoties tas veido neradikālu formu ar disulfīda saiti GSSG. Glutations ir zemmolekulārs tripeptīds (L- $\gamma$ -glutamīl-L-cisteinil glicīns), kas sastopams visās šūnās, kā arī ekstracelulāri plaušu epitēliju klājošā šķidrumā, kur tas ir 140 reizes lielākā koncentrācijā nekā plazmā un pārsvarā reducētā formā [77]. Reducētais glutations oksidējoties reducē  $H_2O_2$  par  $H_2O$  un šo reakciju katalizē GPx (glutaciona peroksidāze).



GSSG pēc tam tiek aizvākts vai atkal reducēts par GSH, iegūstot elektronu no NADPH (nikotīnamīdadenīdinukleotīda fosfāta reducētā forma), kur reakciju katalizē glutaciona reduktāze (GRs) [77].



NADPH - nikotīnamīdadenīdinukleotīda fosfāta oksidētā forma, NADPH<sup>+</sup> - nikotīnamīdadenīdinukleotīda fosfāta reducētā forma, GSSG – glutaciona oksidētā forma, GSH – glutaciona reducētā forma.


Liela uzmanība tiek pievērsta arī mazmolekulāru (neenzimatisku) antioksidantu spējai reducēt oglekļa un skābekļa centrētus radikāļus [64]. Pie galvenajiem neenzimatiskajiem antioksidantiem, kas iesaistīti lipoproteīnu un šūnu membrānu lipīdu aizsardzībā pret oksidantiem, pieder:  $\alpha$  tokoferols ( $\alpha$ TOH- E vitamīns),  $\gamma$  tokoferols, askorbīnskābe (C vitamīns),  $\beta$  karotīns (A vitamīns), urāti,

bilirubīns, flavonoīdi (FAD - flavīnadenīndinukleotīds, FMN - flavīnmononukleotīds u.c.), ubihinols-10 (reducēts koenzīms Q10), albumīns un proteīnu sulfhidrilgrupas (-S-H) [64, 209, 218]. To uzdevums ir ķīmiski ķert vai stabilizēt radikāļus, pārtraucot straujo lipīdu peroksidācijas pašvairošanās fāzi [64]. Piemēram,  $\alpha$ TOH inhibē lipīdu peroksidācijas pašvairošanos reaģējot ar ļoti aktīvo lipīdu peroksilradikāli ( $LOO^\bullet$ ), veidojot daudz mazāk aktīvo lipīdu hidroperoksīdu (LOOH) un oksidēto  $\alpha$  tokoferolu ( $\alpha TO^\bullet$ ).

**11. reakcija.**  $\alpha TOH + LOO^\bullet \rightarrow \alpha TO^\bullet + LOOH$  .

Viena elektrona redukcijas potenciāla rindas kārtība lietojama lai ilustrētu bieži neievērotu principu, ka visas redukcijas un oksidācijas aktīvas vielas, kas tradicionāli tiek iedalītas prooksidantos un antioksidantos, var darboties par elektronu (ūdeņraža atomu) donoriem un elektronu (ūdeņraža atomu) akceptoriem. Piemēram, tā sauktie ķēdi pārtraucošie antioksidanti var funkcionēt par **prooksidantiem** attiecībā uz substrātiem ar mazāku redukcijas potenciālu (sk.1.tab.).

**1. tabula. Viena elektrona standartredukcijas potenciāls dažādiem bioloģiski nozīmīgiem savienojumiem, pH=7,0 (modificēta pēc [64]).**

Spēcīgāki oksidanti	Pāris	$E^0/V$
	$HO^\bullet, H^+/H_2O$	2,31
	$O_3^{\bullet-}, 2H^+/H_2O+O_2$	1,80
	$RO^\bullet, H^+/ROH$ (alifātisks alkoksilradikālis)	1,60
	$HOO^\bullet, H^+/H_2O_2$	1,06
	$ROO^\bullet, H^+/ROOH$	1,00
	alīl $^\bullet, H^+/alīl-H$ (propēns)	0,96
	$O_2^{\bullet-}, 2H^+/H_2O_2$	0,94
	$O_3^{\bullet-}/O_3^{\bullet-}$	0,89
	PNTS $^\bullet, H^+ / PNTS-H$ (polinepiesātinātā taukskābe, bis-alīliskais-H)	0,60
	$HU^{\bullet-}, H^+/UH_2^-$ (urāts)	0,59
	$TO^\bullet, H^+/TOH$ ( $\alpha$ Tokoferols jeb E vitamīns)	0,50
	$H_2O_2, H^+/H_2O, \bullet OH$	0,32
	Askorbāt $^{\bullet-}, H^+/askorbāta\ monoanjons$ (C vitamīns)	0,28
	Fe(III)/Fe(II) (ūdenī)	0,11
	Fe(III)ferritīns, $2H^+/Fe(II)ferritīns$	-0,19
	Riboflavīns / riboflavīn $^{\bullet-}$	-0,32
	$O_2/O_2^{\bullet-}$	-0,33
	$O_2, H^+/HO_2^\bullet$	-0,46
	GSSG/GSSG $^{\bullet-}$ (glutaciona vai cistīna disulfīds)	-1,50
	Spēcīgāki reductanti	$H_2O/e^-$ (ūdenī)

Piemēram, askorbāts un  $\alpha\text{TO}\cdot$ , reiz oksidēti, spēj oksidēt substrātu ar mazāku (negatīvāku) redukcijas potenciālu [64]. Eksperimentāli veikti daži paradoksāli, bet ne negaidīti novērojumi, kur antioksidants kļūst par prooksidantu noteiktās lipīdu un lipoproteīnu sistēmās [64].  $\alpha\text{TOH}$ , piemēram, ir efektīvs brīvo radikāļu ķērājs lipīdu oksidēšanas laikā, kas notiek  $\text{Fe}^{2+}$  klātienē. Turpretī  $\alpha\text{TOH}$  būtiski paātrina lipīdu oksidāciju, kas notiek  $\text{Fe}^{3+}$  klātienē un šo efektu izraisa straujā  $\alpha\text{TOH}$  izraisītā  $\text{Fe}^{3+}$  redukcija par daudz reaģētspējīgāko  $\text{Fe}^{2+}$  [64]. Tādējādi antioksidantu spēja stabilizēt brīvos radikāļus (paužot savas antioksidatīvās īpašības) tiek līdzsvarota pret to spēju atdot elektronu (vai ūdeņraža atomu) vielām, kas var daudz aktīvāk piedalīties dažādās pašvairošanās reakcijās [64].

### 1.3.3.1. HOPS un antioksidatīvā aizsardzības sistēma

1986. gadā Tailors izvirzīja jautājumu “Vai antioksidantu deficīts saistīts ar hronisku obstruktīvu plaušu slimību?” un ziņoja par būtisku saistību starp plazmas antioksidatīvās aizsardzības deficītu un pazeminātu  $\text{FEV}_1/\text{FVC}$  HOPS slimniekiem [490]. Pēc tam novērotas daudz antioksidatīvās sistēmas traucējumu HOPS un astmas slimniekiem, bet pastāv daudz pretrunu šais novērojumos un ir grūti salīdzināt šos pētījumus to dažādā plānojuma dēļ [415].

#### 1.3.3.1.1. Enzimātiskie antioksidanti

##### 1.3.3.1.1.1. Pastiprināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma

Pārsvarā smēķētājiem novērota pastiprināta antioksidatīvās aizsardzības sistēmas aktivitāte. Smēķētājiem novērots būtiski palielināta GSH koncentrācija [77] un GPx aktivitāte epitēliju klājošā šķidrūmā, salīdzinot ar nesmēķētājiem. *In vitro* tabakas dūmi un to kondensāti izraisa II tipa alveolāro epitēlijšūnu A549 bojājumus un caurlaidības palielināšanos, ko vēl vairāk pastiprina intracelulāra GSH koncentrācijas mazināšana ar GSH sintāzes inhibitora- butionīna sulfoksimīna pievienošana, turpretī GSH pievienošana būtiski mazina epitēlija caurlaidību [290, 300]. Bez tam *in vitro* GSH novērš aktivētu alveolāro makrofāgu un neitrofilo leukocītu izdalīto oksidantu izraisītu  $\alpha_1$ -antitripsīna bojājumus [202]. Tas liecina, ka intracelulārajam un ekstracelulārajam GSH ir būtiska nozīme epitēlijšūnu [290] un  $\alpha_1$ -antitripsīna aizsardzībā no iekaisumšūnu un tabakas dūmu oksidantiem. *In vitro* arī novērots, ka (CAT un SOD novērš tabakas dūmu izraisītus žurka trahejas epitēlijšūnu bojājumus [222].



Smēķētājiem kopējā glutaciona koncentrācija BAL būtiski korelē ar BAL neitrofilo leukocītu skaitu un hemotakses aktivitāti, neitrofilo leukocītu MPO un elastāzes koncentrāciju, kā arī ar ECP koncentrāciju. Pie tam kopējā glutaciona koncentrācija BAL būtiski korelē ar tādām lokāli producētām antiproteāzēm, kā SLPI (sekretoriskais leukocītu proteāžu inhibitor) un ACHY (antihemotripsīns), bet ne ar  $\alpha_1$ -proteāžu inhibitoru ( $\alpha_1$ -antitripsīns) [304]. Kopējā glutaciona koncentrācija BAL, kas cenšas pasargāt audus no oksidatīvā stresa, parāda oksidatīvā un iekaisuma stresa līmeni ko izraisa tabakas dūmi [304]. Elpceļu obstrukcija, ko attēlo, kā FEV<sub>1</sub> mazināšanos, būtiski korelē ar BAL GSH koncentrāciju HOPS smēķētājiem [305]. GSH un CAT līmenis veselu smēķētāju eritrocītos arī ir būtiski paaugstināts, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, turpretī GPx aktivitāte būtiski neatšķīrās abām grupām [502]. Arī HOPS slimniekiem novēro būtiski palielinātu asins SOD aktivitāti [81]. Palielināta SOD un CAT aktivitāte asinīs novērota veselām sievietēm, salīdzinot ar veseliem vīriešiem [81]. Kā novērojis Bridžs, veselām smēķējošām un nesmēķējošām sievietēm ir būtiski augstāks arī GSH līmenis eritrocītos nekā vīriešiem, un starp eritrocītu GSH un SOD aktivitāti vērojama būtiska negatīva korelācija [60]. Arī smēķētāju alveolāro makrofāgu SOD un CAT aktivitāte bija būtiski palielināta, bet GPx būtiski neatšķīrās no nesmēķētājiem [327]. Pie tam *in vitro* smēķētāju eritrocīti labāk pasargā pulmonārās artērijas endotēliju no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izraisītiem bojājumiem nekā nesmēķētāju eritrocīti [502]. Eritrocīti asinīs fizioloģiskā koncentrācijā pasargā  $\alpha_1$ -antitripsīnu no tabakas dūmu oksidantu izraisītiem bojājumiem, un būtiska nozīme šai aizsardzības mehānismā ir eritrocītu CAT [321]. Arī pētījumos ar dzīvniekiem novērots, ka tabakas dūmi īpaši palielina žurku plaušu SOD aktivitāti, kā arī mazākā mērā katalāzes un GPx aktivitāti, bet šī antioksidatīvā aizsardzība ir nepietiekama, lai aizsargātu plaušas pret oksidantu kaitīgo iedarbību, par ko liecina pastiprinātā lipīdu oksidācija [468]. Arī pētījumos ar jūrascūciņām, iedarbojoties ar tabakas dūmiem, būtiski palielinās eritrocītu SOD aktivitāte un lipīdu peroksidācija, turpretī GPx aktivitāte būtiski vājinās, bet CAT aktivitāte nemainās [343]. Tabakas dūmu kondensāts arī būtiski palielina GSH koncentrāciju,  $\gamma$ -glutamilsteīna sintetāzes (GSH sintēzē iesaistīts enzīms) aktivitāti un tā mRNS sintēzi alveolārajās epitēlijšūnās. Pie tam  $\gamma$ -glutamilsteīna sintetāzes ekspresija saistīta ar AP-1 [407] un NF-kB atkarīgu procesu [409].

### **1.3.3.1.1.2. Vājināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma**

Turpretī citos pētījumos smēķētājiem novērota vājināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma. Kopējā plazmas antioksidatīvā aizsardzība (noteikta pēc Troloksa ekvivalenta) gan veseliem smēķētājiem, gan HOPS slimniekiem stabilā fāzē un īpaši HOPS slimniekiem paasinājuma laikā bija būtiski vājināta, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [406, 410]. Turpretī lipīdu peroksidācijas produktu koncentrācija plazmā šīm smēķētāju grupām bija būtiski palielināta [406]. Novērota negatīva korelācija starp neitrofilo leikocītu izcelsmes superoksīda anjona izdalīšanās ātrumu un kopējo plazmas antioksidatīvo aizsardzību HOPS paasinājuma gadījumā [406]. Ap 60 gadu veciem smēķētājiem alveolārajos makrofāgos ir būtiski vājināta Cu, Zn SOD, glutaciona S-transferāzes un GPx aktivitāte, salīdzinot ar līdzīga vecuma nesmēķētājiem [278]. Pie tam skābekļa radikāļu izdalīšanās no alveolārajiem makrofāgiem šiem smēķētājiem bija būtiski palielināta [278]. Arī GPx aktivitāte smēķētāju eritrocītos ir būtiski mazāka nekā nesmēķētājiem [144]. Eritrocītu GPx aktivitāte HOPS slimniekiem paasinājuma laikā ir būtiski mazāka nekā veseliem nesmēķētājiem, bet lipīdu peroksidācijas produkta malondialdehīda līmenis plazmā ir būtiski augstāks nekā veseliem nesmēķētājiem [433]. Bez tam smēķējošiem HOPS slimniekiem bija būtiski vājāka GPx aktivitāte eritrocītos un augstāks malondialdehīda līmenis plazmā nekā smēķēt pārtraukušiem HOPS slimniekiem [433]. Arī CAT aktivitāte asinīs HOPS slimniekiem ir būtiski mazāka nekā līdzīga vecuma veseliem cilvēkiem, pie tam CAT aktivitāte ar vecumu mazinās gan veselo, gan HOPS slimnieku grupā [81].

### **1.3.3.1.1.3. Oksidatīvās tolerances modelis**

Pastiprinātā antioksidatīvā aktivitāte eritrocītos, makrofāgos un SOD, CAT aktivitāte, GSH koncentrācija smēķētāju plaušās un dzīvniekiem, kas eksponēti ar tabakas dūmiem, ir antioksidatīvā atbildreakcija uz pastiprinātu oksidantu darbību, ko skaidro ar oksidatīvās tolerances modeli [327], kur iepriekšējs neliels oksidatīvs stress var izraisīt sekojošu adaptīvu rezistenci pret oksidatīvu stresu, iespējams, palielinot antioksidatīvās aizsardzības sistēmas aktivitāti [89, 209, 218, 327, 414, 546]. Piemēram, žurkām, kas 21 dienu eksponētas ar tabakas dūmiem, būtiski palielinājās plaušu glutaciona redukcijas un oksidācijas enzīmu sistēmas aktivitāte: GPx, GRx un glikozo-6-fosfāta dehidrogenāzes aktivitāte, bet nenovēro histoloģiskās pārmaiņas plaušās ar gaismas mikroskopu [546]. Tas norāda, ka īslaicīga zema līmeņa tabakas dūmu iedarbība, kas neizraisa histoloģiskās pārmaiņas plaušās, ir spējīga iniciēt

antioksidatīvās aizsardzības sistēmas aktivitātes palielināšanos plaušās [546]. Tā kā oksidatīvais stress veicina HOPS attīstību, pietiekams adaptīvs antioksidatīvās sistēmas aktivitātes pieaugums var aizsargāt pret oksidantu darbību. Tāpēc vienai daļai smēķētāju attīstās HOPS, bet citiem nē [415]. Iespējams, daļa smēķētāju var palielināt pietiekami plaušu antioksidatīvo enzīmu aktivitāti, bet daļa ģenētisku vai citu vēl nezināmu faktoru dēļ to nevar [415]. Tā, piemēram, žurkām atrasts antioksidantu atbildes apgabals glutaciona S-transferāzes Ya subvienības gēnā un NADPH hinona reduktāzes gēnā 5'-gala apgabalā, kas reaģē uz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un fenoliskiem antioksidantiem, mainot redukcijas unoksidācijas ciklu [422].

### 1.3.3.1.2. Neenzimātiskie antioksidanti

E vitamīna deficīts palielina žurku jutību pret tabakas dūmiem un maina GSH līmeni to plaušās [88]. Lai arī smēķētāju plazmā E vitamīna līmenis būtiski neatšķīrās no nesmēķētājiem, smēķētāju eritrocītiem *in vitro* bija būtiski palielināta tieksme peroksidēties, ko novērsa papildu E vitamīna deva (1000 mg  $\alpha$ -tokoferolskābes dienā 14 dienas) [144]. Pie tam šiem smēķētājiem novēroja pazeminātu askorbāta un paaugstinātu dehidroaskorbāta līmeni plazmā [144]. Līdzīgi rezultāti iegūti, vērtējot lipīdu peroksidāciju pēc izelpas gaisa pentāna koncentrācijas. Veseliem smēķētājiem novēroja būtiski palielinātu pentāna koncentrāciju izelpas gaisā, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, bet E vitamīna koncentrācija plazmā abām grupām būtiski neatšķīrās [231]. Papildu E vitamīna deva (d $\alpha$ -tokoferola 800 mg dienā 14 dienas) smēķētājiem būtiski mazināja pentāna koncentrāciju izelpā, un daļai smēķētāju, kam bija vājināta plazmas selēnatkarīgā GPx aktivitāte, tā atgriezās normas līmenī [231].

Bez tam *in vitro* askorbīnskābe plazmā nodrošina aizsardzību pret lipīdu, bet ne proteīnu oksidāciju, eksponējot plazmu ar gāzes fāzes tabakas dūmiem [108].

*In vitro* A vitamīna pievienošana substrātam būtiski mazina granulocītu hemiluminiscenci (raksturo oksidējamību) un palielina to CAT aktivitāti HOPS slimniekiem un īpaši veselu nesmēķētāju granulocītos [244], kas liecina par šā vitamīna iespējamo nozīmību antioksidatīvajā aizsardzībā.

### 1.3.3.2. Bronhiālā astma un antioksidatīvās aizsardzības sistēma

#### 1.3.3.2.1. Enzimātiskie antioksidanti

##### 1.3.3.2.1.1. Pastiprināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma

Galvenā elpceļu epitēlija virsmas antioksidatīvās aizsardzības sistēma pret skābekļa un slāpekļa radikāļiem ir ekstracelulārā GPx (eGPx) un GSH/GSSG sistēma.

Kā novērots, eGPx aktivitāte ir būtiski palielināta astmas slimnieku elpceļos, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [101]. Arī eGPx mRNS līmenis elpceļu epitēlijšūnās astmas slimniekiem bija būtiski palielināts [101]. *In vitro* novērots, ka bronhu epitēlijšūnās eGPx mRNS līmenis pieaug astoņas reizes pēc inkubēšanas kopā ar skābekļa radikāļiem un GSH [101]. pārmaiņas intra- un ekstracelulārā GSH/GSSG koncentrācijā cieši saistītas ar eGPx ierosināšanu, kas norāda uz redukcijas un oksidācijas mehānismu gēnu ekspresijas regulēšanā [101]. Pastiprināta SOD mRNS, bet ne CAT mRNS ekspresija nomāc eGPx mRNS ekspresiju, kas norāda uz superoksīda būtisku nozīmi šā transkripcijas procesa aktivācijā [101]. Par labu šai teorijai runā novērojumi asinīs, kur GPx un CAT aktivitāte astmas slimniekiem ir palielināta aptuveni par 32%, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, tai pašā laikā ir vājināta SOD aktivitāte [162, 495]. eGPx gēna 5' galā ir identificēts skābekļa radikāļu atkarīgs apgabals [101].

Kopējā glutaciona koncentrācija ierosinātās krēpās ar inhalējamiem kortikosteroīdiem ārstētiem astmas slimniekiem stabilā fāzē būtiski neatšķīrās no veseliem nesmēķētājiem, lai gan astmas slimniekiem tā bija nedaudz palielināta [115]. Arī GSSG pret kopējo glutationu bija nebūtiski palielināta astmas slimnieku ierosināto krēpu supernatantā [115]. Būtiski palielināta GSSG [268] un GSH [466] koncentrācija novērota astmas slimnieku BAL, turpretī SOD aktivitāte BAL astmas slimniekiem neatšķīrās no veseliem nesmēķētājiem [466]. CAT koncentrācija BAL nebija nosakāma pārāk vājās koncentrācijas dēļ [466], kas liecina, ka ierosināto krēpu metode varētu būt piemērotāka šā fermenta noteikšanai.

Eritrocītu CAT [492], GPx [160, 492, 536] un SOD [536] aktivitāte neārstētiem vieglas un smagas astmas slimniekiem būtiski neatšķīrās no veseliem, pie tam glikokortikoīdu terapija būtiski nemainīja šo GPx aktivitāti [160], lai gan SOD aktivitāte ticami negatīvi korelēja ar astmas smaguma pakāpi [536]. Turpretī glutaciona koncentrācija astmas slimnieku eritrocītos bija būtiski lielāka nekā veseliem nesmēķētājiem [520].

SOD aktivitāte gan bronhu epitēlijšūnās (bronhu noskrāpējums), gan BAL šūnās astmas slimniekiem bija lielāka nekā veseliem [467], un bronhu epitēlijšūnās SOD aktivitātei ir cieša saistība ar elpceļu reaktivitāti pret metaholīnu PC<sub>20</sub> pēc FEV<sub>1</sub>  $r^2=89$  ( $r^2$  determinācijas koeficients)  $p=0,005$  [467].

### **1.3.3.2.1.2. Vājināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma**

Turpretī citos pētījumos astmas slimniekiem novērota vājināta antioksidatīvās aizsardzības sistēma. Kopējā plazmas antioksidatīvā aizsardzība (vērtēta pēc Troloksa ekvivalenta) astmas slimniekiem ir būtiski vājināta, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, bet lipīdu peroksidācijas produktu koncentrācija plazmā būtiski palielināta [406]. Astmas slimniekiem (nakts astmas) novēro būtiski vājinātu asins GPx aktivitāti, bet stipri palielinātu malondialdehīda (lipīdu peroksidācijas produkts) līmeni, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [210]. Arī nealerģiskas astmas slimniekiem konstatēta būtiski pazemināta eritrocītu GPx aktivitāte [259]. Līdzīga būtiski vājināta eritrocītu GPx aktivitāte atklāta bērniem stabilā kontrolētas astmas stadijā [400]. Arī aspirīna astmas slimniekiem biežāk sastopama mazināta asins GPx aktivitāte [320].

Kā novērojis Filips, SOD aktivitāte asinīs astmas slimniekiem ir būtiski mazāka nekā veseliem brīvprātīgiem [162]. Arī ar astmu slimojošiem bērniem asins SOD aktivitāte bija būtiski vājāka gan paasinājuma laikā, gan pēc tā, salīdzinot ar veseliem bērniem [451]. Arī CAT aktivitāte asinīs, ar astmu slimiem bērniem bija būtiski mazāka asimptomātiskā periodā, salīdzinot ar veseliem bērniem [360]. Eritrocītu SOD aktivitāte neārstētiem vieglas [160, 492] un smagas [160] astmas slimniekiem bija būtiski vājāka, salīdzinot ar veseliem, pie tam glikokortikoīdu terapija būtiski nemainīja SOD aktivitāti [160]. Turpretī bērniem stabilā kontrolētas astmas stadijā nenovēro būtiskas pārmaiņas eritrocītu SOD aktivitātē [400].

### **1.3.3.2.2. Neenzimātiskie antioksidanti**

Vieglas astmas slimniekiem novērots būtiski pazemināts C (askorbīnskābes) un E ( $\alpha$  tokoferola) vitamīna līmenis BAL, salīdzinot ar veseliem brīvprātīgiem, turpretī C, E vitamīna [268, 536], kā arī  $\beta$  karotīna [536] līmenis plazmā bija normas robežās un būtiski neatšķīrās no to koncentrācijas veseliem brīvprātīgiem. Arī bērniem stabilā kontrolētas astmas stadijā nenovēro būtiskas pārmaiņas C u E vitamīna koncentrācijā plazmā [400]. Turpretī citos pētījumos astmas slimnieku serumā novērota būtiski vājināta C vitamīna koncentrācija, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [520].

Plazmas Se (selēna) koncentrācija neārstētiem vieglas un smagas astmas slimniekiem būtiski neatšķīrās no veseliem, kā arī inhalējama glikokortikoīda (beklometazona dipropionāta) terapija jūtami nemainīja Se koncentrāciju plazmā

[160]. Turpretī citos pētījumos Se un Zn koncentrācija plazmā vieglas astmas slimniekiem bija būtiski mazāka nekā veseliem brīvprātīgiem, un Se koncentrācija negatīvi korelēja ar 8-izo-PGF<sub>2α</sub> (izoprostāns- lipīdu peroksidācijas produkts) koncentrāciju plazmā [536].

#### 1.4. Proteolītiskie un antiproteolītiskie fermenti

Kā 1963. gadā novērojuši Laurels un Eriksons, cilvēkiem ar iedzimtu seruma proteīna  $\alpha_1$ -antitripsīna (elastāzes u.c. serīna proteīnāžu inhibitors) deficītu ir paaugstināts emfizēmas risks [296]. Elastīns kā mērķis neitrofilo leukocītu elastāzei ir galvenais alveolārās sienas komponents, un tā sašķeltie fragmenti, darbojoties par hemotaksīniem neitrofiliem leukocītiem un makrofāgiem, kas savukārt izdala proteāzestāpēc iekaisums var pastiprināties [296]. *In vitro* smēķētāju alveolāro makrofāgu izdalītie oksidanti mazina  $\alpha_1$ -antitripsīna aktivitāti par 60% epitēliju klājošā šķidrumā, salīdzinot ar nesmēķētāju alveolārajiem makrofāgiem, turpretī, pievienojot SOD un CAT, šis efekts tiek novērsts [235]. Tas norāda uz oksidantu spēju inaktivēt antiproteāzes un mazināt to antiproteolītisko efektu, izjaucot proteāžu un antiproteāžu līdzsvaru. Šie novērojumi ir pamatā proteāžu un antiproteāžu līdzsvara trūkuma teorijai, kur līdzsvara trūkums starp proteīnāzēm un antiproteīnāzēm izraisa plaušu destrūkciju [296]. Šo trūkumu var veidot vai nu palielināta proteīnāžu izdalīšanās un aktivitāte, vai antiproteīnāžu mazināta izdalīšanās un inaktivācija [296].

Neitrofilo leukocītu elastāze ir nozīmīgs elastīnu šķeļošs proteolītisks enzīms, kas iesaistīts HOPS attīstībā, sagraujot plaušu elastīgo karkasu, palielinot gļotu sekrēciju un pasliktinot mukociliāro klīrensu [252, 473]. Gan HOPS slimniekiem, gan smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas ir būtiski palielināts elastīna šķeļšanas produkts uDES un iDES salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [476]. Hroniska bronhīta un astmas slimniekiem ierosinātās krēpās ir būtiski palielināts gan kopējās, gan aktīvās elastāzes daudzums, salīdzinot ar veseliem smēķētājiem un veseliem nesmēķētājiem, un tā korelē gan ar neitrofilo leukocītu relatīvo skaitu krēpās, gan apgriesti ar elpceļu obstrukciju (FEV<sub>1</sub>) [516]. Tas norāda, ka elpceļu iekaisums gan astmas, gan HOPS gadījumā saistīts ar paaugstinātu aktīvas elastāzes līmeni, kam, iespējams, ir nozīme elpceļu pārstrukturācijā [516]. HOPS slimnieku ierosinātās krēpās neitrofilo leukocītu elastāze korelē arī ar asins proteīnu caurlaidību (krēpu/seruma albumīna attiecība) plaušās [221]. *In vitro* proteāzes: neitrofilo leukocītu elastāze, kolagenāze un neitrofilo

leikocītu kathepsīns-G jau vājā koncentrācijā izraisa spēcīgu epitēlija atslāņošanu no bronhu bazālās membrānas [330]. Pie tam neliela oksidantu ( $H_2O_2$ ) klātiešana šo efektu palielina pat 10 reizes, kas norāda, ka proteāžu un oksidantu darbība ir sinerģiska [330]. Oksidanti vieni paši epitēlija atdalīšanos no bazālās membrānas izraisa daudz lielākā koncentrācijā [330].  $\alpha_1$ -antitripsīna pievienošana būtiski mazina elastāzes izraisīto epitēlija atslāņošanu [330]. Bez tam arī tāda antioksidanta kā GSH pievienošana būtiski mazina kolagenāzes un kathepsīna-G izraisīto epitēlija atslāņošanu [330]. HOPS slimnieku ierosinātās krēpās neitrofilo leikocītu elastāzes aktivitāte negatīvi korelē ar SLPI (sekretoriskais leikoproteāžu inhibitors) aktivitāti [221], kas arī norāda uz proteāžu un antiproteāžu līdzsvara traucējumu plaušās.

Kaut arī neitrofilo leikocītu elastāze, iespējams, ir galvenā proteināze, kas iesaistīta HOPS patoģenēzē iedzimta  $\alpha_1$ -antitripsīna deficīta gadījumā [296], tā var arī nebūt iesaistīta HOPS patoģenēzē, kas attīstās pēc kaitīgu vielu ieelpošanas [296]. Arī citas proteināzes, piemēram, neitrofilo leikocītu kathepsīns-G, neitrofilo leikocītu proteināze-3, makrofāgu kathepsīns-B, makrofāgu kathepsīns-L, makrofāgu kathepsīns-S, kā arī dažādas MMP (matriksa metaloproteināzes), ko izdala neitrofilie leikocīti, makrofāgi, tuklās šūnas un baktērijas, var dot savu ieguldījumu plaušu audu destrukcijā [452].

Gan astmas (60% gadījumu), gan HOPS (85% gadījumu) slimnieku ierosinātās krēpās novērota būtiski palielināta MMP-9 aktivitāte, kā arī antiproteāzes TIMP-1 līmenis, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [83]. Bez tam astmas slimniekiem konstatēta arī pastiprināta MMP-2 aktivitāte biežāk (50% gadījumu), salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem (5% gadījumu) [83]. Smēķējošiem HOPS slimniekiem, kam nav  $\alpha_1$ -antitripsīna deficīta, stabilā fāzē ir būtiski palielināts neitrofilo leikocītu elastāzes  $\alpha_1$ -proteināzes inhibitora kompleksa koncentrācija ierosinātās krēpās, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem [170].

$\alpha_1$ -antitripsīns veidojas hepatocītos un, iespējams, arī makrofāgos. Biežāk sastopams ir normālais PiMM  $\alpha_1$ -antitripsīna gēna fenotips (aptuveni 90% cilvēku). Homozigotiskā PiZZ fenotipa (Ziemeļamerikā sastopams 0,012% gadījumu) gadījumā cirkulējošā  $\alpha_1$ -antitripsīna daudzums ir tikai 10% no normālā līmeņa, un ir augsts emfizēmas risks (80% gadījumu attīstās). PiMZ heterozigotiem ir vidējs  $\alpha_1$ -antitripsīna līmenis plazmā [174]. Cita būtiska antiproteāze ir SLPI (sekretorais leikoproteāzes inhibitors) kura palielināta mRNS ekspresija novērota bronhu epitēlijšūnās, un tā der bronhu epitēlijšūnu aizsardzībai pret neitrofilo leikocītu

elastāzi [2]. Kā redzams iepriekš, HOPS un astmas gadījumā bieži ir gan paaugstināts proteāžu līmenis plaušās, gan arī paaugstināts antiproteāžu līmenis, kas, iespējams, ir organisma atbildreakcija uz pastiprināto proteāžu izdalīšanos no šūnām iekaisuma gadījumā, bet šī antiproteolītiskā aizsardzība ir nepietiekama. Bez tam antiproteāzes var inaktivēt arī oksidanti [79, 94, 318], kas izdalās no šūnām, kā arī atrodas tabakas dūmos.

## **2. Ierosināto krēpu metode**

### **2.1. Krēpu ierosināšanas drošība**

Ierosinot krēpas 15 astmas slimniekiem un 14 veseliem brīvprātīgiem izmantoja ultraskaņas inhalatoru ar 3%, 4% un 5% NaCl šķīdumu, kur katras koncentrācijas inhalācijas laiks 10 min. I. Pina krēpu ierosināšanas drošību novērtēja par kritēriju izmantojot spirometrijas rādītājus ( $FEV_1\%$  krišanos no pirmsiedarbības līmeņa) [387]. Pirms hipertonska sāls šķīduma inhalācijas pacientiem divas reizes tika dots ieelpot pa 200  $\mu$ g salbutamola, kā arī veikta spirometrija pirms un 10 min pēc salbutamola inhalācijas. Pēc tam veica krēpu ierosināšanu ar hipertonsku sāls šķīdumu, kā arī spirometriju ik pēc 5 min. Ja  $FEV_1\%$  nokrita vairāk nekā par 20% pirmsiedarbības līmeņa, ierosināšanu pārtrauca. Vidējais  $FEV_1\%$  kritums veselo cilvēku grupā bija 0%, bet astmas slimnieku grupā- 5,3%. Ierosināšanu pārtrauca tikai vienam astmas slimniekam, kad  $FEV_1\%$  pazeminājās vairāk nekā par 20% (nokrita par 30%), bet to viegli atjaunoja izejas līmenī pēc papildu  $\beta_2$  agonista inhalācijas [387]. I. Pina šo krēpu ierosināšanas metodi ar hipertonsku sāls šķīdumu atzīst par drošu gan veseliem, gan astmas slimniekiem, ja pirms sāls šķīduma inhalācijas tiek lietoti inhalējamie  $\beta_2$  agonisti [387].

Balstoties uz līdzīgu pētījumu rezultātiem, arī Grotendorsts norāda, ka krēpu ierosināšana ar hipertonsku sāls šķīdumu ir droša, ja lieto inhalējamus  $\beta_2$  agonistus vidēji smagas un smagas astmas gadījumā [205]. Veicot krēpu ierosināšanu ar hipertonsku sāls šķīdumu 20 pusaudžiem ar vidēji smagu un smagu atopisku astmu pēc salbutamola ( $\beta_2$  agonists) inhalācijas,  $FEV_1$  pieauga, salīdzinot ar pirmssalbutamola līmeni, par  $9,0 \pm 2,6\%$  [205].

### **2.2. Krēpu ierosināšanas metodes**

Krēpu ierosināšanu izmantojot ultraskaņas inhalatoru, iespējams veikt gan ar hipertonsku (3-5%), gan izotonisku (0,9%) NaCl ūdensšķīdumu, gan hipotonisku-destilētu ūdeni, gan uridīna trifosfāta ūdensšķīdumu [24, 205, 228, 387, 485].



### **2.2.1. Krēpu ierosināšana, izmantojot hipertonusu un izotonisku nātrija hlorīda šķīdumu**

Salīdzinot krēpu ierosināšanu ar ultraskaņas inhalatoru (30 min), izmantojot hipertonusu (3-5%) un izotonisku (0,9%) sāls šķīdumu, astmas slimniekiem ierosinātās krēpās nenovēro būtiskas atšķirības šūnu relatīvajā skaitā [24]. Hipertonisks sāls šķīdums nemaina šūnu sastāvu, kā arī ir ticama korelācija starp abām metodēm eozinofilo un neitrofilo leukocītu, limfocītu un makrofāgu relatīvajā skaitā, kas liecina, ka šūnas netiek rekrutētas inhalācijas laikā [24]. Turpretī hipertonusis sāls šķīdums, ja iepriekš nav lietoti  $\beta_2$  agonisti, izraisa bronhokonstrikciju krietni vairāk pacientiem un būtiski palielina bronhu reaktivitāti pret metaholīnu, salīdzinot ar izotonisku sāls šķīdumu [24]. Bronhokonstrikcija un pastiprinātā bronhu hiperreaktivitāte pēc hipertonusa sāls šķīduma inhalācijas var netieši norādīt uz iekaisuma mediatoru izdalīšanos [24]. Krēpu ierosināšanu ar hipertonusu sāls šķīdumu arī var izmantot par brohoprovokācijas testu, lai noteiktu fiziskas slodzes izraisītu astmu, kam raksturīga pastiprināta elpceļu jutība pret osmolaritātes pārmaiņām elpceļos [11].

### **2.2.2. Krēpu ierosināšana, izmantojot uridīna 5'-trifosfātu**

Salīdzinot 5 min ilgu krēpu ierosināšanu ar ultraskaņas inhalatoru, izmantojot hipertonusu (3% NaCl) sāls un uridīna 5'-trifosfāta (5 mg/ml uridīna trifosfāta, kas šķīdināts 0,9% NaCl ūdensšķīdumā) šķīdumu, veseliem cilvēkiem un vieglas līdz vidēji smagas astmas slimniekiem, novēro divreiz lielāku ierosināto krēpu producēšanas daudzumu, izmantojot uridīna trifosfātu [485]. Pie tam būtiski mazāka PEF krišanās bija, izmantojot uridīna trifosfātu [485]. Abām krēpu ierosināšanas metodēm diferenciālais un absolūtais šūnu skaits ierosinātās krēpās būtiski neatšķīrās [485]. Tas norāda uz uridīna 5'-trifosfāta šķīduma labāku piemērotību krēpu ierosināšanā.

### **2.3. Krēpu ierosināšanas ietekme uz šūnu sastāvu ierosinātās krēpās**

Pati krēpu ierosināšana ar ultraskaņas inhalatoru, izmantojot hipertonusu sāls šķīdumu, var mainīt šūnu sastāvu ierosinātās krēpās. Holcs norāda: ja veic divas atkārtotas krēpu ierosināšanas divas dienas pēc kārtas (ar 24 h starplaiku), otrajā reizē pieaug neitrofilo leukocītu (par 17,4% veseliem un 14,6% astmas slimniekiem) un sarūk makrofāgu relatīvais skaits gan astmas slimnieku, gan veselu cilvēku grupā, bet eozinofilo leukocītu un limfocītu relatīvais skaits būtiski nemainās [228]. Arī vienas

ierosināšanas laikā var mainīties ierosināto krēpu relatīvais šūnu skaits. Krēpu ierosināšanu veic 30 min, un krēpu paraugus katras 10 min savāc secīgi atsevišķos konteineros. Salīdzinot šo paraugu relatīvo šūnu skaitu, gan veselu cilvēku, gan vieglas astmas slimnieku grupā Holc konstatē, ka krēpu ierosināšanas laikā būtiski mazinās neitrofilo leukocītu relatīvais skaits abām pētītajām grupām (astmas slimniekiem no 36,9- 29,8% līdz 16,3% un veseliem cilvēkiem no 43,6- 17,2% līdz 18,0%), būtiski palielinās relatīvais makrofāgu skaits, bet eozinofilo leukocītu skaits būtiski nemainās ne veseliem cilvēkiem, ne astmas slimniekiem [227, 228]. Krēpu ierosināšanas laikā novēro arī ECP būtisku mazināšanos abām cilvēku grupām [227].

#### **2.4. Krēpu vākšanas metodes**

Lai salīdzinātu divas krēpu vākšanas metodes, 11 astmas slimniekiem tika veiktas četras krēpu ierosināšanas pa 20 min ar 4% NaCl šķīdumu, izmantojot ultraskaņas inhalatoru. Divas atkārtotas krēpu ierosināšanas visiem slimniekiem veica, izmantojot pirmo metodi, kur ierosināšanas laikā krēpas un siekalas savāca vienā konteinerī. Divas krēpu ierosināšanas veica, izmantojot otro metodi, proti, ierosināšanas laikā krēpas savāca vienā, bet siekalas otrā konteinerā [180]. Izmantojot otro metodi, krēpu daudzums un plakano epitēlijšūnu relatīvais skaits bija būtiski mazāks, nekā izmantojot pirmo metodi. Tas norāda uz mazāku siekalu piejaukumu. ECP līmenis krēpās bija būtiski augstāks, izmantojot otro metodi, bet diferenciālais šūnu skaits bija vienāds abām metodēm, izņemot neitrofilos leukocītus, kuru relatīvais skaits bija būtiski augstāks, izmantojot pirmo metodi [180]. Eozinofilo leukocītu un ECP līmeņa atkārtojamība bija vienāda abām metodēm. Tāpēc par labāku tika atzīta otrā metode, kur krēpas tiek vāktas atsevišķi no siekalām, tāpēc krēpās ir mazāks siekalu piejaukums [180].

Lai mazinātu siekalu piejaukumu ierosinātās krēpās, E. Picikīni iegūtās krēpas pirms to apstrādes selektīvi sadalīja divās daļās [391]. Pirmajā daļā atdalīja to krēpu daļu, kas noteikti nākusi no plaušām (krēpu korķi), bet otrajā daļā- pārpalikumu, kur pārsvarā ir siekalas, bet arī ar krēpu piejaukumu. Krēpu ierosināšanu veica, izmantojot ultraskaņas inhalatoru ar hipertonusu sāls šķīdumu (3%, 4%, 5% 7 min katru koncentrāciju), pirms katras atkrēpošanas liekot izšņaukt degunu un izskalot muti ar ūdeni, lai mazinātu siekalu piejaukumu [391]. Krēpu ierosināšanu veica sešiem veseliem un deviņiem nesmēķējošiem astmas slimniekiem. Krēpu paraugus Petri trauciņā sadalīja: pirmajā daļā - no plaušām nākusi daļa, kur neredz siekalu

piejaukumu, viskozākā daļa, ja vizuāli nevarēja atšķirt, izmantoja apgriesto fāžu kontrastmikroskopiju, tā daļa, kur mazāks plakano epitēlijšūnu skaits, un otrā daļā-pārpalikums [391]. Pirmajā daļā novēroja būtiski mazinātu plakanā epitēlija šūnu relatīvo skaitu (siekalu piejaukums), būtiski palielinātu kopējo šūnu skaitu, būtiski lielāku dzīvo neplakano šūnu skaitu, augstāku preparāta kvalitāti un būtiski augstāku ECP līmeni. Starp paraugiem nebija būtisku atšķirību eozinofilo un neitrofilo leukocītu un limfocītu relatīvajā skaitā, bet makrofāgu relatīvais skaits pirmajā daļā bija būtiski mazāks. Turpretī absolūtais dzīvo makrofāgu, eozonofilo, neitrofilo leukocītu un limfocītu skaits bija būtiski lielāks pirmajā daļā. E. Picikīni secina, ka selektētā krēpu porcija (1) pārsvarā pārstāv zemāko elpošnas trakta daļu, bet nedaudz palielināto makrofāgu relatīvo skaitu (ne absolūto) skaidro ar sliktāku šās pārpalikuma porcijas (2. daļa) preparātu kvalitāti [391], kur vieglāk identificēt makrofāgus nekā citas neplakanās šūnas. Šās metodes priekšrocības ir mazāks siekalu piejaukums un augstāka preparāta kvalitāte, bet trūkumus- kļūdaini selektējot siekalu vietā krēpas, iespējams pieļaut kļūdu kopējā šūnu skaita rezultātos, kā arī darbietilpīgāka krēpu apstrāde.

## 2.5. Krēpu apstrādes metodes

Lai noteiktu, kā ierosināto krēpu šķelšana ar ditiotreitolu (DTT) ietekmē šūnu skaitīšanas rezultātus un bioķīmiskos krēpu supernatanta mērījumus A. Eftimiadis veica pētījumu ar 20 astmas slimniekiem, kam vienu daļu ierosināto krēpu šķēla ar DTT, kas šķīdināts fosfāta buferī, bet otru daļu atšķaidīja ar fosfāta buferi bez DTT. Ar DTT šķeltās krēpās bija būtiski mazināts dzīvo šūnu absolūtais skaits, krietni palielināts šūnu absolūtais skaits un palielināta ECP koncentrācija supernatantā, turpretī eozinofilo, neitrofilo leukocītu, makrofāgu, limfocītu relatīvais skaits būtiski neatšķīrās. Arī IL-5 un IL-8 koncentrācija supernatantā būtiski neatšķīrās no krēpām, kas apstrādātas ar fosfāta buferi bez DTT [147]. Kaut arī DTT mazina šūnu dzīvotspēju, tas neietekmē šūnu diferenciālās skaitīšanas rezultātus un daudz efektīvāk disperģē šūnu sakopojumus krēpās, ļaujot precīzāk noteikt šūnu absolūto skaitu un ECP koncentrāciju.

Bez DTT ierosināto krēpu šķelšanai var lietot arī tripsīnu, un, kā norāda I. Pina, šūnu absolūtās skaitīšanas datu atkārtojamība starp paraugiem, kas šķelti ar DTT un tripsīnu, ir augsta ( $R_i=0,85$ ) un būtiski neatšķiras [387].

## 2.6. Datu atkārtojamība

Sākumā krēpu ierosināšanas metode tika lietota, lai diagnosticētu *Pneumocystis carinii* pulmonāru infekciju HIV slimniekiem, bet I. Pina pirmā piemēroja šo metodi absolūtā un relatīvā krēpu šūnu skaita iegūšanai astmas slimniekiem [387]. Lai analizētu šūnu skaitīšanas datu atkārtojamību, sešiem astmas slimniekiem un sešiem veselīgiem brīvprātīgiem nedēļas laikā tika veiktas divas atkārtotas krēpu ierosināšanas, izmantojot ultraskaņas inhalatoru ar hipertonusu NaCl šķīdumu 3%, 4%, 5% 10 min ar katru koncentrāciju. Krēpu kvalitāti vērtēja ar apgriesto mikroskopu pēc krēpu korķu daudzuma, nosakot (nav korķu-0,  $\leq 4,5 \times 9^{-1}$  mm,  $> 4,5 \times 9^{-2}$  mm) un plakanā epitēlija daudzuma krēpu paraugā, veicot kopējo šūnu skaitīšanu ( $> 10\%$ -0,  $\leq 10\%$ -1, 0%-2), kā arī pēc plakanā epitēlija šūnu skaita uztriepes preparātā (par daudz plakanā epitēlija-0, daudz plakanā epitēlija-1, nav plakanā epitēlija-2). Summējot pēc šās punktu sistēmas, ja paraugu vērtē ar  $\geq 4$ – to uzskata par adekvātu, ja punktu skaits  $< 4$ , bet  $> 2$ – par vidēji labu, bet ja punktu skaits  $\leq 2$ – par neadekvātu un turpmāk neizmanto. Krēpu šķelšanai I. Pina lietoja tripsīnu, jo, kā viņa norāda, šūnu absolūtās skaitīšanas datu atkārtojamība starp paraugiem, kas šķelti ar DTT un tripsīnu, ir liela abos gadījumos ( $R_i=0,85$ ) [387]. Datu atkārtojamība starp atkārtotām krēpu ierosināšanām (vērtēta pēc klašu iekšējā korelācijas koeficienta) bija laba eozinofiliem leukocītiem ( $R_i=0,8$ ), metahromatiskām šūnām ( $R_i=0,7$ ), makrofāgiem ( $R_i=0,71$ ) un neitrofiliem leukocītiem ( $R_i=0,73$ ), bet slikta datu atkārtojamība bija absolūtajam šūnu skaitam ( $R_i=0,25$ ) [387].

Veicot divas atkārtotas krēpu ierosināšanas ar vismaz divu dienu starplaiku, izmantojot ultraskaņas inhalatoru, ar ko inhalēja 4,5% NaCl šķīdumu vieglas līdz smagas astmas slimniekiem, kopējos krēpu paraugos (pēc ierosināšanas krēpas netiek atdalītas no siekalām) tika vērtēta šūnu absolūtā un relatīvā skaita, kā arī bioķīmisko raksturlielumu atkārtojamība. Atkārtojamība (vērtēta pēc klašu iekšējā korelācijas koeficienta) starp atkārtotām krēpu ierosināšanām bija būtiska neitrofiliem ( $R_i=0,57$ ), eozinofiliem leukocītiem ( $R_i=0,85$ ), limfocītiem ( $R_i=0,76$ ), albumīnam ( $R_i=0,71$ ), fibrinogēnam ( $R_i=0,88$ ), IL-8 ( $R_i=0,66$ ) un ECP ( $R_i=0,82$ ) [239]. Arī E. Picikīni konstatē ticami lielu atkārtojamību (vērtēta pēc klašu iekšējā korelācijas koeficienta) visu šūnu veidu relatīvajam skaitam un supernatanta ECP, MBP, EDN, albumīna, fibrinogēna, triptāzes un IL-5 koncentrācijai, izņemot limfocītu relatīvo skaitu un kopējo šūnu skaitu, ar hipertonusu sāls šķīdumu divas reizes sešu dienu laikā

ierosinātās krēpās, kas atdalītas no siekalām un šķeltas ar 0,1% DTT [390]. Krēpu ierosināšana veikta veseliem cilvēkiem, astmas slimniekiem un smēķētājiem ar neobstruktīvu bronhītu [390].

A. Spanevello, lai vērtētu ierosināto krēpu šūnu skaitīšanas datu atkārtojamību starp selektētām krēpu porcijām (krēpu korķiem), dažādu pētnieku šūnu skaitīšanas rezultātiem un divu nedēļas laikā atkārtotu krēpu ierosināšanas rezultātiem, ierosināja krēpas izmantojot ultraskaņas inhalatoru ar 4,5% NaCl šķīdumu 53 astmas, 16 sezonāla rinīta slimniekiem un 19 veseliem cilvēkiem. Pēc šķelšanas ar DTT krēpu šūnas uz stikliņiem tika klātas, izmantojot citospinu. Atkārtojamība (noteikta pēc klašu iekšējā korelācijas koeficienta  $R_i$ ) starp krēpu korķiem (divi korķi no viena parauga) bija ticami augsta makrofāgiem ( $R_i=0,86$ ), neitrofiliem leukocītiem ( $R_i=0,85$ ), limfocītiem ( $R_i=0,77$ ), epitēlijšūnām ( $R_i=0,83$ ), kopējam šūnu skaitam ( $R_i=0,92$ ) un ECP ( $R_i=0,92$ ) [469]. Atkārtojamība starp paraugiem, kas iegūti dažādās dienās, bija augsta makrofāgiem ( $R_i=0,76$ ), neitrofiliem leukocītiem ( $R_i=0,75$ ), eozinofiliem leukocītiem ( $R_i=0,84$ ), un ECP ( $R_i=0,70$ ), bet vidēji zema epitēlijšūnām ( $R_i=0,56$ ), zema limfocītiem ( $R_i=0,39$ ) un kopējam šūnu skaitam ( $R_i=0,44$ ) [469]. Atkārtojamība starp pētniekiem (divi pētnieki skaita vienu un to pašu stikliņu) bija augsta visām šūnām: makrofāgiem ( $R_i=0,97$ ), neitrofiliem leukocītiem ( $R_i=0,98$ ), eozinofiliem leukocītiem ( $R_i=0,99$ ), limfocītiem ( $R_i=0,88$ ), epitēlijšūnām ( $R_i=0,95$ ) [469].

Lai vērtētu ierosināto krēpu šūnu diferenciālās skaitīšanas datu atkārtojamību starp pētniekiem R. Vords ierosināja krēpas 31 astmas slimniekam un 7 veseliem cilvēkiem [528]. Atkārtojamība starp pētniekiem (noteikta pēc klašu iekšējā korelācijas koeficienta  $R_i$ ) bija augsta eozinofiliem leukocītiem ( $R_i=0,9$ ), neitrofiliem leukocītiem ( $R_i=0,89$ ) un makrofāgiem ( $R_i=0,9$ ), vidēja epitēlijšūnām ( $R_i=0,69$ ), bet zema limfocītiem ( $R_i=0,29$ ) [528]. Pie tam atkārtojamība bija labāka paraugiem, kas atzīti par labiem (plakanais epitēlijs <20% un šūnu dzīvotspēja >50%), salīdzinot ar paraugiem, kuros ir daudz plakanā epitēlija un vāja šūnu dzīvotspēja (plakanais epitēlijs  $\geq 20\%$  un šūnu dzīvotspēja  $\leq 50\%$ ) [528]. Arī E. Picikīni norāda: ja plakanā epitēlija šūnu relatīvais skaits ir <20%, diferenciālās šūnu skaitīšanas precizitāte ir lielāka [391].

Ierosināto krēpu metode ir precīza elpceļu iekaisuma vērtēšanas metode ar augstu šūnu diferenciālās skaitīšanas atkārtojamību starp pētniekiem, atkārtotu krēpu ierosināšanām ar vairāku dienu starplaiku, un atsevišķiem krēpu paraugiem tādām

šūnām kā eozinofilie un neitrofilie leukocīti, makrofāgi, kā arī ar labu bioķīmisko analīžu rezultātu atkārtojamību krēpu supernatantā [239, 387, 390, 469, 528]. Turpretī slikta atkārtojamība ir kopējam šūnu skaitam, limfocītu skaitam un vidēja epitēlijsūnu diferenciālam skaitam, kas, iespējams, ir saistīts ar šo šūnu nelielo skaitu preparātā, limfocītu grūto atpazīstamību un epitēlijsūnu nevienmērīgo sadalījumu preparātā [387, 390, 469, 528]. Palielināts plakanā epitēlija šūnu relatīvais skaits un vājināta šūnu dzīvotspēja mazina šūnu skaitīšanas atkārtojamību [391, 528].

## **2.7. Ierosināto krēpu metode salīdzinājumā ar bronhoalveolāro lavāžu un bronhu biopsiju**

Salīdzinot ierosināto krēpu un BAL šūnu diferenciālās skaitīšanas datus, astmas slimniekiem neitrofilo leukocītu relatīvais skaits bija būtiski lielāks ierosinātās krēpās ( $40\pm 7\%$ ), salīdzinot ar BAL ( $6\pm 1\%$ ), turpretī makrofāgu un limfocītu relatīvais skaits bija būtiski lielāks BAL (makrofāgi  $75\pm 4\%$ , limfocīti  $8\pm 2\%$ ), salīdzinājumā ar ierosinātām krēpām (makrofāgi  $44\pm 7\%$ , limfocīti  $0,5\pm 0,2\%$ ) [316]. Būtiska eozinofilo leukocītu relatīvā skaita atšķirības starp ierosinātām krēpām ( $14\pm 4\%$ ) un BAL ( $8\pm 4\%$ ) netika novērotas [316]. Līdzīgu tendence vērojama arī D. Grotendorsta un V. Kītingas pētījumā, kur astmas slimnieku ierosinātās krēpās bija lielāks neitrofilo leukocītu relatīvais skaits nekā BAL un BW, bet makrofāgu, limfocītu un metahromatisko šūnu (tuklās šūnas un bazofilie leukocīti) skaits lielāks BAL un BW nekā ierosinātās krēpās [204, 266], turpretī eozinofilo leukocītu skaits līdzīgs ierosinātās krēpās, BAL un BW [204]. Atšķirībā no P. Maestrelli un D. Grotendorsta, V. Kītinga ierosinātās krēpās konstatē daudz lielāku eozinofilo leukocītu relatīvo skaitu nekā BW un BAL astmas slimniekiem [266]. Līdzīga aina novērota, salīdzinot stabila hroniska bronhīta slimnieku spontāni izdalīto krēpu un BAL šūnu relatīvo skaitu: neitrofilo leukocītu relatīvais skaits bija būtiski lielāks krēpās, bet makrofāgu un limfocītu relatīvais skaits būtiski lielāks BAL, savukārt eozinofilo leukocītu skaits būtiski neatšķīrās [316]. Būtiska korelācija bija starp ierosināto krēpu un BAL eozinofilo leukocītu relatīvo skaitu [204, 316], starp BAL eozinofilo leukocītu relatīvo skaitu un zemgļotādas eozinofilo leukocītu skaitu (bronhu biopsijas mēriāls), kā arī līdzīga tendence, bet ar zemāku ticamību starp ierosināto krēpu un zemgļotādas eozinofilo leukocītu skaitu astmas slimniekiem [316]. Turpretī būtiska saistība netika novērota starp krēpu, BAL, BW un biopsiju pārējo iekaisumsūnu- neitrofilo leukocītu, makrofāgu- skaitīšanas datiem [204, 316]. Atšķirībā no abiem iepriekš minētiem autoriem, V. Kītinga

konstatē būtisku korelāciju starp ierosināto krēpu un BW eozinofilo un neitrofilo leukocītu relatīvo skaitu astmas slimniekiem, turpretī starp ierosināto krēpu un BAL šūnu skaitīšanas datiem būtisku korelāciju nenovēro [266].

Limfocītu skaitīšanas dati ir atšķirīgi. P. Maestrelli neatrada būtisku korelāciju starp ierosināto krēpu, BAL un bronhu biopsijā iegūto limfocītu skaitu, bet D. Grotendorsts novēro būtisku korelāciju starp ierosināto krēpu un BAL CD4+ limfocītu skaitu un līdzīgu tendenci CD8+ limfocītiem, kā arī līdzīgu korelācijas tendenci starp ierosināto krēpu un BW limfocītiem [204, 316]. Tāpat kā P. Maestrelli, D. Grotendorsts arī nekonstatē būtisku korelāciju starp ierosināto krēpu un bronhu biopsijas limfocītu absolūto skaitu [204, 316]. Salīdzinot šūnu skaitīšanas datu saderību starp ierosinātām krēpām, BAL un bronhu biopsiju 26 cilvēku grupai, kurā ietilpa astmas, hroniska bronhīta slimnieki stabilā un paasinājuma laikā, saderība starp visām trim metodēm tika novērota 58% gadījumu, saderība starp ierosinātām krēpām un BAL 69% gadījumu, saderība starp ierosinātām krēpām un bronhu biopsiju 77% gadījumu, saderība starp BAL un biopsiju 69% gadījumu [316].

P. Maestrelli arī iesaka normas augšējo robežu eozinofilo leukocītu skaitīšanas datiem ierosinātās krēpās, BAL un bronhu biopsijā zemgļotādā veselu nesmēķējošu cilvēku grupai. Šos lielumus viņš aprēķināja kā vidējo aritmētisko plus divas standartnovirzes un ieguva: ierosinātām krēpām 9%, BAL 1%, bronhu zemgļotādai 20 šūnas/mm<sup>2</sup> [316].

Palielinātais neitrofilo leukocītu relatīvais skaits un mazinātais makrofāgu relatīvais skaits ierosinātās krēpās norāda, ka ierosinātās krēpas nāk no vairāk proksimāliem bronhiem, salīdzinot ar BW un BAL, kas vairāk pārstāv procesus respiratorajās bronhiolās un alveolās [266, 316]. Pie tam šīs atšķirības nav hipertonska šāls šķīduma izraisītas, jo tāda pati tendence atklāta spontāni izdalītās krēpās hroniska bronhīta slimniekiem [266, 316]. Arī ierosināto krēpu šūnu relatīvais skaits neatšķiras ar hipertonsku šāls šķīdumu un izotonisku šāls šķīdumu ierosinātām krēpām [24] (sk. iepriekš). Tomēr, kā redzams no citu autoru pētījumiem, krēpu ierosināšana, iespējams, var mainīt šūnu skaitu krēpās ilgstošas ierosināšanas laikā vai otrā dienā pēc ierosināšanas [227, 228] (sk. iepriekš). Bez tam ierosinātās krēpas, salīdzinot ar bronhu biopsiju, vairāk raksturo intralumenāro iekaisumu [204]. Atšķirībā no bronhu biopsijas, BW un BAL, ko iegūst bronhoskopijas laikā, krēpu ierosināšana ir vienkārša, neinvazīva, viegli paciešama, ne pārlietu dārga procedūra

bez nozīmīgām blaknēm bronhu iekaisuma vērtēšanai astmas un HOPS slimniekiem [204, 266, 316].

### **3. Darba mērķis**

Izmantojot ierosināto krēpu metodi, novērtēt plaušu pārmaiņas, kas attīstās smēķēšanas dēļ slimniekiem ar obstruktīvām plaušu slimībām.

### **4. Darba uzdevumi**

1. Analizēt citoloģisko raksturlielumu pārmaiņas ierosinātās krēpās un asinīs atkarībā no smēķēšanas stāža HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī veseliem cilvēkiem.
2. Analizēt antioksidatīvo fermentu aktivitātes un kopējās antioksidatīvās aizsardzības (substrāta oksidējamība) pārmaiņas ierosinātās krēpās un asinīs atkarībā no smēķēšanas stāža HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī veseliem cilvēkiem.
3. Analizēt sakarību starp citoloģiskiem un bioķīmiskiem raksturlielumiem (antioksidatīvo fermentu un substrāta oksidējamība) ierosinātās krēpās un asinīs.



## Materiāls un metodika

### 1. Pacienti

Pavisam pētījumā tika izmeklēti 121 brīvprātīgs P. Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas pulmonoloģijas nodaļas slimnieks un vesels brīvprātīgais. Pētījumā iekļāva tikai tās personas, no kurām izdevās iegūt adekvātu krēpu paraugu (plakanais epitēlijs <30%) un pietiekamā daudzumā (vismaz 2 ml). Izmeklējamās personas tika iedalītas trīs grupās atkarībā no FEV<sub>1</sub>/FVC%, FEV<sub>1</sub>% reversibilitātes pēc bronhodilatācijas un bronhu reaktivitātes (sk. 2. tab.).

#### 2. tabula. Pacientu grupu iedalījums

Grupa	FEV <sub>1</sub> /FVC%	FEV <sub>1</sub> % reversibilitāte	Reaktivitāte PD <sub>20</sub> (mg)
Veseli cilvēki	≥70	<12	>4,8
HOPS slimnieki	<70	<12	>1
Astmas slimnieki	-	un/vai ≥12	un/vai ≤4,8

Pētāmo grupu raksturlielumi apkopoti 3. tabulā.

#### 3. tabula. Pacientu grupu raksturojums (vidējais aritmētiskais ± vidējā aritmētiskā 95% reprezentācijas intervāls, minimums, maksimums)

Grupa	Skaitis	Vecums (gadi)	Smēķē (pak-gadi)	FEV <sub>1</sub> % pirms bronhodilatācijas	FEV <sub>1</sub> % reversibilitāte	Reaktivitāte PD <sub>20</sub> (mg)
Veseli cilvēki	38	42,1±4,2 18-69	9,0±3,7 0-40	106,8±4,3 80,0-132,0	1,77±1,80 -17,0-+5,5	>4,8 (n=14)
HOPS slimnieki	30	56,0±5,1 19-78	22,3±5,6 0-50	55,7±9,3 17,0-102,2	4,94±1,71 -6,9-+10,7	3,17 (-1,86 +5,07) 1,76-4,82 (n=6)
Astmas slimnieki	29	40,9±5,6 19-65	5,3±3,8 0-40	77,4±8,1 29,3-118,2	18,24±4,55 -0,3-+54,8	0,34 (-0,087 +0,66) 0,000-4,82 (n=24)

Neviena pētījumā iekļautā persona pēdējo mēnesi pirms pētījuma nebija lietojusi glikokortikoīdus un fosfodiesterāzes inhibitorus.

### 2. Bronhodilatācijas tests

Visiem pacientiem iepriekšējā dienā tika veikta ārējās elpošanas pārbaude, izmantojot Master Screen spirogrāfu JAEGER MS PNEUMO (Vācija). Pirms spirogrāfijas viņi nedrīkstēja lietot bronhodilatatorus. Pacienti veica forsētas izelpas

un ieelpas mēģinājumus, un, kad trīs izelpas mēģinājumu grafiki būtiski neatšķīrās, tie tika uzskatīti par adekvātiem un aprēķināts: FVC, FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/VC%, MEF<sub>75</sub>, MEF<sub>50</sub>, MEF<sub>25</sub>, ko arī izteica procentos no individuālās normas. Pēc tam pacientiem inhalēja β<sub>2</sub> agonistu (400 μg. salbutamolu no dozējamā inhalatora *Ventolin*), izmantojot krājtelu BECLOMET, un pēc 15 min veica atkārtotu spirogrāfiju, no kuras tika aprēķināta FEV<sub>1</sub> un pārējo raksturlielumu reversibilitāte. FEV<sub>1</sub> reversibilitāti aprēķināja kā starpību starp FEV<sub>1</sub>% no normas 15 min pēc β<sub>2</sub> agonista inhalācijas un FEV<sub>1</sub>% no normas pirms inhalācijas.

### 3. Bronhoprovokācijas tests

Testam izmantoja sterilu 0,1%, 1% un 5% metaholīna šķīdumu, kur par šķīdinātāju lietoja izotonisku (0,9%) NaCl ūdensšķīdumu. Preparāta dozētai inhalācijai izmantoja mūsu izstrādāto aerosola dozēšanas metodi un iekārtu, kas bija saslēgta kompleksā ar sprauslas inhalatoru AI-1 (Krievija) un krājtelu BECLOMET ar 850 ml tilpumu. Krājtelpa tika uzpildīta ar aerosolu 6 s. Pēc 2 s pacientam 1-2 s laikā lika ieelpot no krājtelpas un aizturēt elpu uz 3 s, pēc tam veica mierīgu izelpu. Šo ieelpas mēģinājumu veica no mierīgas izelpas līmeņa (FRC) līdz pilnas ieelpas līmenim (TLC). AI-1 inhalatora ar aerosola dozēšanas iekārtu ražīgums 6 s iesmidzināšanas režīmā, bija 13,07±0,59 mg šķidrums, gāzes ražīgums 183 ml/s (6 s 1098 ml), ja spiediens ir 80 kP, no krājtelpas pacientā nonākušā izsmidzinātā šķidrums daudzums - 6,87±0,31mg. Pirms bronhoprovokācijas un 2-3 min pēc katras inhalācijas tika noteiktas un vērtētas bronhu caurlaidības pārmaiņas, spirometriski nosakot FEV<sub>1</sub>. Ja bronhu caurejamība mazinājās būtiski, tur FEV<sub>1</sub> nokritās vairāk nekā par 20% pirmsiedarbības līmeņa, testu pārtrauca un pacientam tika inhalēts salbutamols, izmantojot krājtelu (sk. 4. tab). Par izejas FEV<sub>1</sub> lielumu ņēma vidējo no trim FEV<sub>1</sub> mērījumiem pirms šķīdinātāja inhalācijas (sk. 4. tab.).

No iegūtiem datiem, automatizēti aproksimējot, tika aprēķināta provokācijas kumulatīvā deva PD<sub>20</sub>- metaholīna kumulatīvā deva miligramos, kuras gadījumā FEV<sub>1</sub> nokrities par 20% pirmsiedarbības līmeņa. Kumulatīvā deva tika aprēķināta tāpēc, ka metaholīnam ir kumulatīva iedarbība uz bronhu gludo muskulatūru.

#### 4. tabula. Bronhoprovokācijas gaita

Nr. p.k.	Procedūra	Inhalētā viela	Procedūru skaits	Kumulatīvā deva (mg)
1.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	3	-
2.	Inhalācija	Šķīdinātājs (0,9%NaCl H <sub>2</sub> O)	2	-
3.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	1	-
4.	Inhalācija	Metaholīns (0,1%)	2	0,014
5.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	1	-
6.	Inhalācija	Metaholīns (1%)	1	0,084
7.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	1	-
8.	Inhalācija	Metaholīns (1%)	2	0,22
9.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	1	-
10.	Inhalācija	Metaholīns (5%)	1	0,57
11.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	1	-
12.	Inhalācija	Metaholīns (5%)	2	1,30
13.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	1	-
14.	Inhalācija	Metaholīns (5%)	5	3,00
15.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	1	-
16.	Inhalācija	Metaholīns (5%)	5	4,80
17.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	1	-
18.	Inhalācija	Salbutamols (100µg)	4	400 µg
19.	Spirometrija (FEV <sub>1</sub> )	-	1	-

#### 4. Krēpu ierosināšana

Krēpu ierosināšana tika veikta pēc modificētas I. Pinas izstrādātās metodes [387]. Spirometriju veica pirms un 15 min pēc 400 µg salbutamola inhalācijas, izmantojot krājtelu, kā arī ik pēc 5 min hipertonskā sāls šķīduma inhalācijas laikā. Pirms katras spirometrijas lūdzām izskalot muti un kaklu, mēģināt atklepot un iesplaut krēpas trauciņā. 4% NaCl šķīdums tika inhalēts 2,5 ml/min ar ultraskaņas inhalatoru (TUR-USI 50 Vācija), kur daļiņu aerodinamiskais masas mediānas diametrs bija 5,5 µm, līdz tika iegūti 5 ml krēpu vai ierosināšanas ilgums sasniedza 30 min. Ja FEV<sub>1</sub> pazeminājās >20% pēc bronhodilatācijas līmeņa, krēpu ierosināšana tika pārtraukta.

#### 5. Ierosināto krēpu apstrāde

Iegūtās krēpas tika glabātas ledusskapī +4°C temperatūrā līdz turpmākai apstrādei ne ilgāk kā 2 h [393]. Lai krēpas sašķeltu, tās tika sajauktas ar pēc masas

līdzīgu daudzumu 1 mM DTT šķīdumu Henksa buferētā fizioloģiskā šķīdumā (HBSS) un inkubētas 12-15 min 37°C temperatūrā. Inkubācijas laikā ik pēc 3 min paraugs tika samaisīts, mēģeni kratot [393, 496].

0,5 ml sašķeltā parauga atšķaidīja ar 0,475 ml HBSS un krāsoja, pievienojot 0,025 ml. 1% genciānvioletā ūdensšķīduma, ko izmantoja kopējai šūnu skaitīšanai Neibauera kamerā (skaitīja no 2x400 mazajiem kvadrātiem). Atsevišķi skaitīja plakanā epitēlija šūnas un pārējās kodolainās šūnas.

1 ml sašķeltā parauga skaloja (atšķaidīja 9 ml HBSS un centrifūgēja 10 min ar 1000xg lielu paatrinājumu, nolēja supernatantu, bet sedimentu resuspendēja nelielā HBSS tilpumā) un izmantoja divu uztriepes preparātu gatavošanai, kurus krāsoja pēc Meja-Grīnvalda-Gimzas metodes.

**Meja-Grīnvalda-Gimzas metode.** Nožāvētus uztriepes preparātus 10 min. fiksēja metanolā. Kad preparāts nožuva to 6 min krāsoja ar 0,25% Meja-Grīnvalda šķīdumu metanolā, kas atšķaidīts ar vienādu, pēc tilpuma, daudzumu destilēta ūdens. Pēc tam krāsu nolēja un pēc starpskalošanas ar buferētu destilētu ūdeni (pH 6,9), krāsoja ar 1/50 ūdenī atšķaidītu Gimzas krāsu (pH 6,7) 10 min. Pēc tam preparātus īslaicīgi skaloja ar buferētu destilētu ūdeni (pH 6,9) un žāvēja (modificēta I. Pinas metode [387]).

Diferenciālā šūnu skaitīšana notika, skaitot šūnas no diviem uztriepes preparātiem - no katra stikliņa pa 400 identificējamām kodolainām pulmonāras izcelsmes šūnām (bronhu epitēlijšūnas un leikocīti) un atsevišķi plakanā epitēlija šūnas [387]. Ja vidējais plakanā epitēlija daudzums uztriepes preparātos un Neibauera kamerā bija >30% paraugu uzskatīja par nederīgu sakarā ar palielinātu siekalu piejaukumu.

No atlikušā sašķelto krēpu daudzuma, 15 min centrifūgējot (paatrinājums 4400xg), atdalīja supernatantu.

0,5 ml supernatanta atšķaidīja ar 0,5 ml 5% trihloretikskābi, centrifūgēja 15 min (paatrinājums 4400xg), lai izgulsnētu proteīnus, un atsūca 0,1 ml supernatanta, lai kolorimetriski noteiktu urīnvielas koncentrāciju.

Pārējo sašķelto krēpu supernatantu sasaldēja sašķidrinātā slāpekļī (-195,8°C temperatūrā), kur to glabāja turpmākām bioķīmiskām analīzēm.

## 6. Asins apstrāde

Asinis tika ņemtas no elkoņa vēnas pirms ēšanas, tūlīt pēc krēpu ierosināšanas izmantojot standartvakutainerus ar Li heparīnu (VENO Ject II Terumo Corporation, Beļģija). Asins paraugi tūlīt pēc iegūšanas tika novietoti ledusskapī +4°C temperatūrā, kur tika glabāti ne ilgāk kā 2 h.

Nedaudz asiņu tika izmantots, lai gatavotu uztriepes preparātus pēc Meja-Grīnvalda-Gimzas metodes.

**Meja-Grīnvalda-Gimzas metode.** Nožāvētus uztriepes preparātus 3 min fiksēja metanolā, 6 min krāsoja ar 0,25% Meja-Grīnvalda šķīdumu metanolā, kas atšķaidīts ar vienādu, pēc tilpuma, daudzumu destilēta ūdens, pēc tam krāsu nolēja un bez starpskalošanas krāsoja ar 1/50 destilētā ūdenī atšķaidītu Gimzas krāsu (pH 6,7) 12 min. Pēc tam preparātus īslaicīgi skaloja ar buferētu ūdeni (pH 7) un žāvēja.

Diferenciālo leikocītu skaitīšanu veica no diviem stikliņiem pa 100 šūnām no katra.

No pārējā asins daudzuma centrifūgējot (15 min. 1000xg) atdalīja plazmu.

0,1 ml plazmas atšķaidīja ar 0,9 ml 5% trihloretiķskābes, centrifugēja 15 min (paatrinājums 4400xg), lai izgulsnētu proteīnus, un atsūca 0,1 ml supernatanta, lai kolorimetriski noteiktu urīnvielas koncentrāciju.

Atlikušo plazmu sasaldēja sašķidrinātā slāpekļī (-195,8°C temperatūrā), kur glabāja turpmākām bioķīmiskām analīzēm.

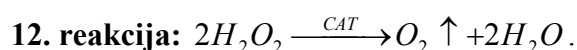
## 7. Bioķīmiskās analīzes

Plazmu atsaldēja 20 min 20°C temperatūrā, bet krēpu supernatantu- 20 min 36°C temperatūrā. Pēc tam paraugus centrifugēja 20 min. (paatrinājums 5000xg).

Krēpu supernatantā noteica katalāzes un glutaciona peroksidāzes aktivitāti, substrāta oksidējamību ar hemiluminiscences metodi un urīnvielas koncentrāciju. Asins plazmā noteica glutaciona peroksidāzes aktivitāti, substrāta oksidējamību ar hemiluminiscences metodi,  $\alpha_1$ -antiproteāzes un urīnvielas koncentrāciju.

### 7.1. Katalāzes aktivitātes noteikšana

Katalāze ir ferments, kas sadala  $H_2O_2$  neradikālā ceļā.



CAT aktivitātes noteikšanas pamatā ir  $H_2O_2$  spēja reakcijā ar molibdēna sāļiem veidot stabilu krāsotu produktu [3], kam nosaka absorbciju. Mēs izmantojām šās metodes modifikāciju [279].

1. Gatavo:	analīzi	kontroli	blanku
------------	---------	----------	--------

Reakcijas sastāvdaļas:

1) paraugs	50 µl	-	50 µl
2) H <sub>2</sub> O (bidestilāts)	-	50 µl	2 ml
3) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,03%)	2 ml	2 ml	-

2. Inkubē (10 min 37°C).

3. Pievieno amonija molibdenāta šķīdumu (1 ml 4%).

4. Nosaka absorbciju (spektrofotometriski  $\lambda=410$  nm):

1) analīzei pret blanka šķīdumu,

2) kontrolei pret destilētu ūdeni.

5. Aprēķina katalāzes aktivitāti pēc 1. formulas (katalāzes molārās ekstinkcijas koeficients  $\varepsilon=22,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

**1. formula:** 
$$B = \frac{(A_{an} - A_{kontrolē}) \cdot 10^6 \cdot V_1 \cdot h}{\varepsilon \cdot b \cdot V_2 \cdot t}$$

B- fermenta aktivitāte (U/l);

A<sub>an</sub>- analizējamā parauga absorbcija;

A<sub>kontrolē</sub>- kontrolparauga absorbcija;

h- parauga atšķaidījums;

V<sub>1</sub>- reakcijas maisījuma kopējais tilpums (l);

V<sub>2</sub>- analizējamā parauga tilpums (l);

t- reakcijas laiks (min);

$\varepsilon$ - molārās ekstinkcijas koeficients ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

## 7.2. Glutaciona peroksidāzes aktivitātes noteikšana

Glutaciona peroksidāze ir ferments, kas sadala gan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gan lipīdu peroksīdus reducētā glutaciona klātienē.



Tā aktivitāti nosaka spektrofotometriski pēc oksidētā glutaciona daudzuma, kas veidojas reakcijas gaitā [518].

1. Gatavo:	analīzi	kontroli
------------	---------	----------

Reakcijas sastāvdaļas:

1) paraugs	0,2 ml	-
2) H <sub>2</sub> O (bidestilāts)	-	0,2 ml
3) fosfāta buferis	1 ml	1 ml

(0,3 M pH=7,4 ar  $\text{NaN}_3$  12 mM un EDTA 6 mM)

4) GSH (2,5 mM) 0,5 ml 0,5 ml

2. Inkubē (5 min 37°C).

3. Pievieno  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 ml 1,8 mM).

4. Inkubē (2 min 37°C).

5. Pievieno aukstu trihloretilskābi (1 ml 10% 4°C).

6. Centrifugē (2500xg).

7. Nosaka supernatanta absorbciju (spektrofotometriski  $\lambda=260$  nm):

1) analīzei pret destilētu ūdeni,

2) kontrolei pret destilētu ūdeni.

8. Aprēķina glutationa peroksidāzes aktivitāti pēc 1. formulas (GSSG molārās ekstinkcijas koeficients  $\epsilon=3,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### **7.3. Substrāta oksidējamības noteikšana ar hemiluminiscences metodi**

Luminolatkarīgā hemiluminiscence balstās uz brīvo radikāļu īpašību rekombinācijas laikā izdalīt gaismas kvantu [449]. Luminolatkarīgā hemiluminiscence tika reģistrēta, izmantojot hemiluminometru EMELITE 1105 (Krievija, BCM).

1. Samaisa reakcijas komponentus:

1) paraugu (10  $\mu\text{l}$ ),

2) fosfāta buferi (2 ml 0,2 M pH=7,8),

3) luminolu (100  $\mu\text{l}$   $1 \cdot 10^{-4}$  M).

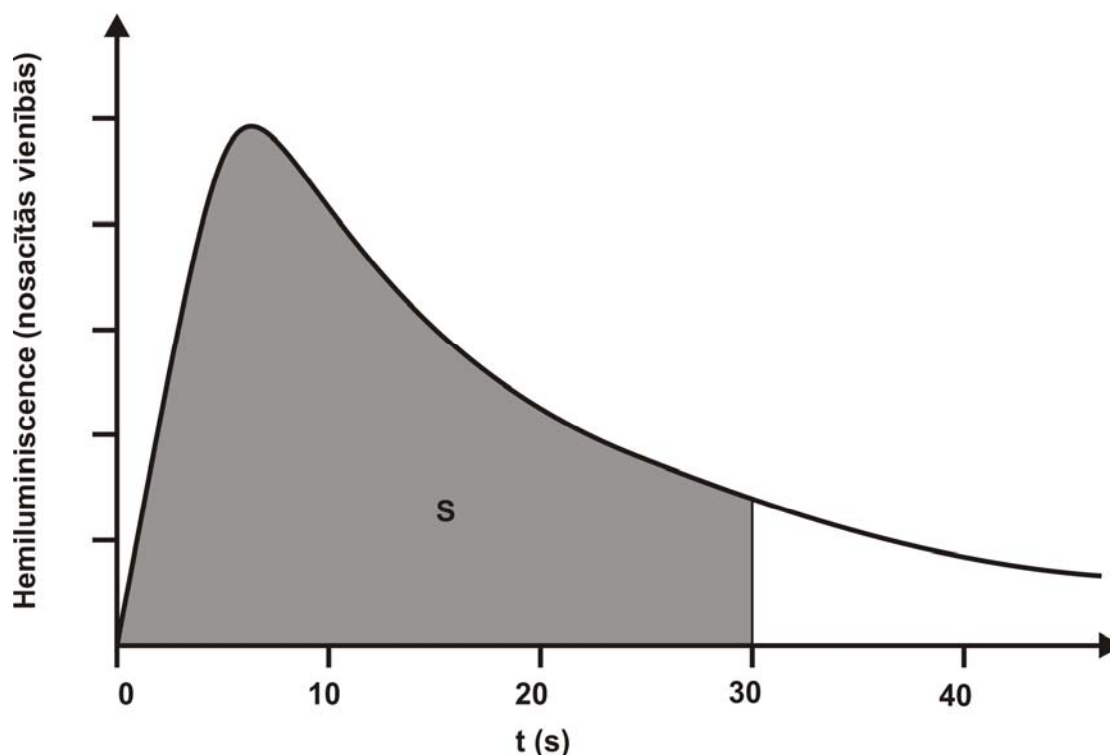
2. Ievieto maisāmā termostatējamā hemiluminometra kivetē (37°C temperatūrā 3 min).

3. Ierosina hemiluminiscenci, pievienojot  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 ml 0,03%).

4. Reģistrē hemiluminiscences līkni (30 s).

5. Pēc līknes nosaka S (laukums zem līknes), kas raksturo substrāta oksidējamību (sk. 5. att.) [487].

Rezultāti tika izteikti nosacītās vienībās.



**5. attēls.** Luminolatkarīgās hemiluminiscences (nosacītās vienībās) atkarība no reakcijas laika (s) un laukums zem līknes (S), kas raksturo substrāta oksidējamību.

#### 7.4. $\alpha_1$ -antiproteāzes koncentrācijas noteikšana

$\alpha_1$ -antiproteāzes koncentrāciju noteica imūnturbidimetriski, izmantojot analizatoru “COBAS E MIRA”/ ROCHE;I Nr...-001/. Metode balstās uz spēju cilvēka  $\alpha_1$ -antiproteāzei veidot precipitātu ar specifisku antiserumu, un to mērī turbidimetriski  $\lambda=340$  nm (“DAKO” firmas instrukcija  $\alpha_1$ -antiproteāzes noteikšanai; Zawta B. “Probenstabilitat” 1996, 6-7; Friedman R. B., “Effects of disease on clinical laboratory tests” 1989 3-21-22; Wallach J. “Interpretation of diagnostic tests” 1992, 213, 357).

Reaģenti

Reaģents: firmas “DAKO” R1 5 ml anti-  $\alpha_1$ -antiproteāzes T antiserums (truša) 0,1 M NaCl, kas stabilizēts ar 15 mM nātrija azīda:

1) darba reaģentu gatavo, atšķaidot 500  $\mu$ l R1 ar 2800  $\mu$ l diluenta bufera, ko lieto par sākuma reaģentu;

2) par pamatreāģentu lieto reakcijas buferi;

3) par diluentu uz iekārtas lieto dilūcijas buferi.

Standarti un kalibratori:

1) kalibrators “DAKO” human serum protein calibrator;



2) standartizācija ar CRM 470/ IFCC/ BCR/ CAP referens/.

Kontroles sistēma un kontroles materiāli:

- 1) iekšējās kvalitātes kontrole “ROCHE” serum protein T control;
- 2) ārējā kontrole DGKC (Vācija) – divi kontroles materiāli četras reizes gadā.

Mērījumu robežas: 0,3- 7,0 g/l.

## 7.5. Urīnvielas koncentrācijas noteikšana

Metode balstās uz urīnvielas spēju skābā vidē tiosemikarbazīda un  $\text{Fe}^{3+}$  jonu klātienē, reaģējot ar diacetilmonoksīmu, veidot sarkanas krāsas kompleksu, ko var noteikt fotokolorimetriski (Crocker C. L. Am. J. Med. Technol. 33, 361 (1967); Breinek P., Bouda’J. Vnitri lēk. 2, 186 (1970); Chromy V., Medek J., Party V. Čs. autorskē osvedčeni 157 989).

Urīnvielas koncentrācijas noteikšanai izmantoja LACHEMA. a/s BIO-LA-TEST “Urea 450” reaģentu komplektu un SF-46 LOMO (Krievija) fotokolorimetru.

Reaģenta sastāvs:

diacetilmonoksīms 5,0 mM/l;  
 tosemikarbazīds 0,9 mM/l;  
 sērskābe 0,9 M/l;  
 trīsvērtīgās dzelzs sāls 25,0  $\mu\text{M/l}$ ;  
 destilēts ūdens.

Tāpat kā paraugu, arī standarta urīnvielas šķīdumu (16,65  $\mu\text{M/l}$ ) atšķaidīja attiecībā 1/10 ar trihloretiķskābi.

1. Gatavo:	analīzi	standartu	kontroli
------------	---------	-----------	----------

Reakcijas sastāvdaļas:

1) paraugs	200 $\mu\text{l}$	-	-
2) urīnviela	-	200 $\mu\text{l}$	-
3) $\text{H}_2\text{O}$ (destilēts)	-	-	200 $\mu\text{l}$
4) reaģents	4 ml	4 ml	4 ml

2. Inkubē 10 min 100°C temperatūrā.

3. Atdzesē 10°C temperatūrā.

4. Nosaka absorbciju (kolorimetriski  $\lambda=490- 540 \text{ nm}$ ):

- 1) analīzei pret kontroli;
- 2) standartam pret kontroli.

5. Aprēķina urīnvielas koncentrāciju paraugā pēc 2. formulas.

**2. formula:** 
$$C_p = \frac{C_s \cdot A_p \cdot h_p}{A_s \cdot h_s}.$$

$C_p$  - urīnvielas koncentrācija paraugā (mM/l)

$C_s$  - urīnvielas koncentrācija standartā (16,65 mM/l)

$A_p$  - parauga absorbcija;

$A_s$  - standarta absorbcija;

$h_p$  - parauga atšķaidījums;

$h_s$  - standarta atšķaidījums.

## 8. Datu statistiskā analīze

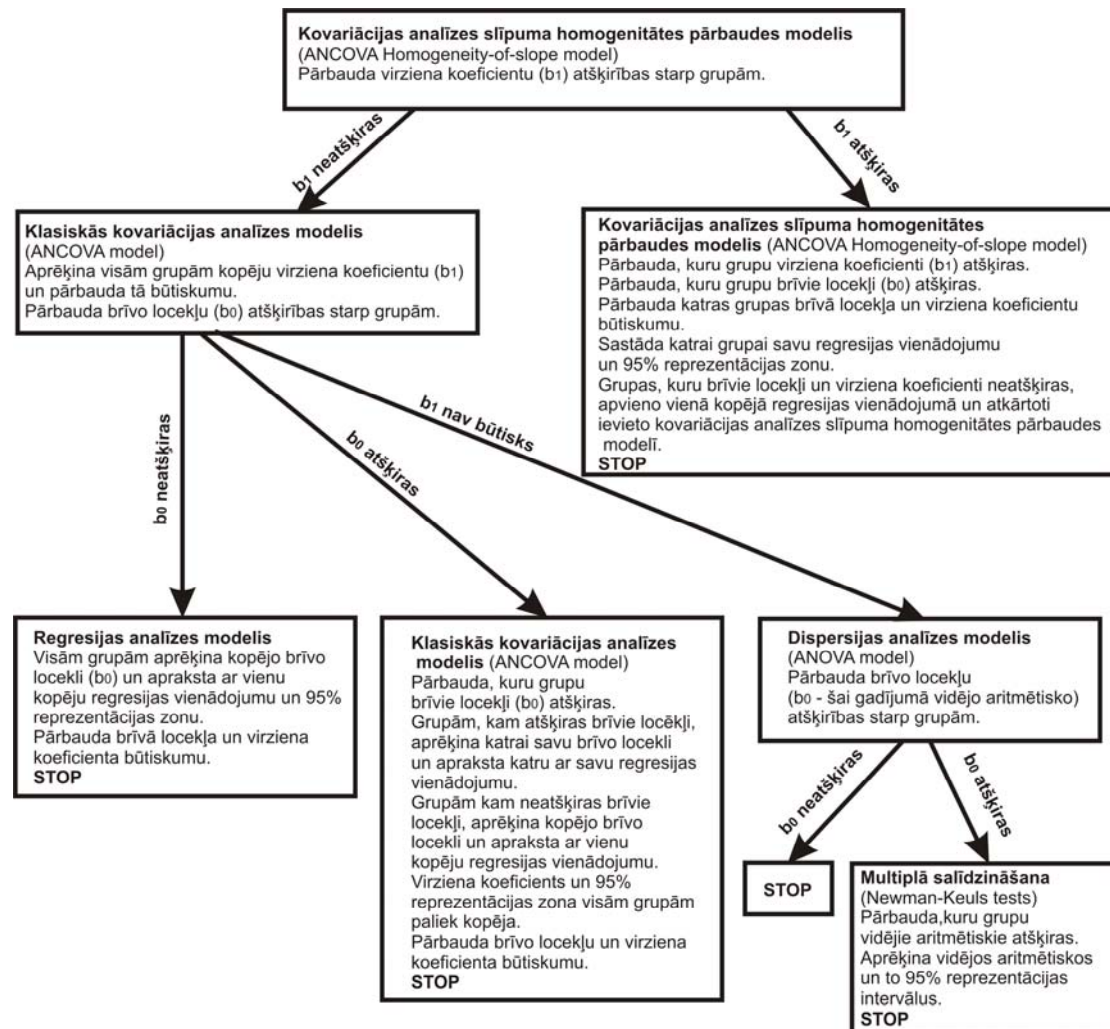
### 8.1. Lietotie analīžu modeļi un to secība

Datu statistiskai analīzei izmantoja datorprogrammas “**Statistica 6.0**” apakšnodaļas: “Vispārējais lineārais modelis” (general linear models- GLM) un “Vispārējais linearizējamais modelis” (general linearized models- GLZ). Sākumā katrai slimnieku grupai atsevišķi starp interesējošo atkarīgo faktoru un pēc kārtas katru neatkarīgo faktoru veica vienfaktora regresijas analīzi, vienlaikus vizualizējot grafikā.

Pēc tam neatkarīgos faktoros, kam bija kaut neliela ietekmes tendence uz atkarīgo faktoru, pakāpeniski ievietoja kopējā modelī. Sākumā izveidoja vairākfaktoru (div -, trīs - utt.) kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modeli (analysis of covariance - ANCOVA homogeneity – of - slope model), kur viens no neatkarīgajiem faktoriem ir diskrētais (categorical predictor) kvalitatīvais faktors “Diagnoze” ar trim klasēm “Vesels”, “HOPS”, “Astma”, bet pārējie neatkarīgie faktori ir nepārtrauktie kvantitatīvie (continuous predictors) faktori: “Smēķēšanas anamnēze” u.c. Izveidotajam modelim ar Fišera kritēriju pārbaudīja visu neatkarīgo faktoru un to mijiedarbību ietekmes būtiskumu uz pētīto atkarīgo faktoru. Nebūtiskie faktori vai to mijiedarbības tika izslēgtas no modeļa, un izveidots jauns modelis 360.-376. lpp. [550], 266.-293. lpp. [301] (sk. 6. att.).

Ja diskrētā faktora mijiedarbība ar nepārtraukto faktoru izrādījās būtiska (taisnes virziena koeficienti -  $b_1$  koeficienti būtiski atšķīrās starp pacientu grupām- atšķirīgi līkņu slīpumi), kā arī vismaz viena no modelī ietilpstošajām regreijām (diskrētā faktora klasēm) bija būtiska, tad izmantojot iepriekš minēto kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modeli pārbaudīja starp kurām grupām virziena koeficienti ( $b_1$ ) atšķiras, pārbaudīja kurām grupām brīvie locekļi ( $b_0$ ) atšķiras,

pārbaudīja virziena koeficientu un brīvo locekļu būtiskumu, sastādīja visām grupām regresijas vienādojumus un 95% reprezentācijas zonas. Grupas, kuru brīvie locekļi un virziena koeficienti neatšķīrās apvienoja vienā kopējā regresijas vienādojumā un atkārtoti ievietoja kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modeli [550] 266-293. lpp. [301] (sk. 6. att.).



**6. attēls. Statistiskās analīzes principiālā shēma divfaktoru analīzei** (divu neatkarīgo faktoru: viena diskrētā, otra nepārtrauktā). Pēc līdzīga principa statistisko analīzi veica arī trīs- un četrfaktoru analīzes gadījumā. Modificēta J. H. Zara 1999.gada shēma [550].

Turpretī, ja diskrētā faktora mijiedarbība ar nepārtraukto faktoru nebija būtiska vai nebija atšķirības tendences (taisnes virziena koeficienti-  $b_1$  koeficienti būtiski neatšķīrās starp pacientu grupām- vienādi līkņu slīpumi), kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modeli aizstāja ar klasiskās kovariācijas analīzes modeli (šai modelī taisnes virziena koeficientu aprēķina visām grupām kopēju, atšķiras tikai līkņu augstumi -  $b_0$  - brīvie koeficienti- diskrētā faktora klases). Šai

modelī nav iekļautas diskrētā un nepārtraukto neatkarīgo faktoru mijiedarbības 360.-376. lpp. [550] 266.-293. lpp. [301] (sk. 6. att.).

Ja diskrētā faktora “Diagnozes” ietekme ( $b_0$  koeficienti starp slimnieku klasēm atšķiras) uz atkarīgo faktoru bija būtiska, vai izpaudās ietekmes tendence, izmantojot iepriekš minēto klasiskās kovariācijas analīzes modeli, pārbaudīja, kuru grupu brīvie locekļi ( $b_0$ ) atšķiras. Grupām, kam atšķīrās brīvie locekļi, aprēķināja katrai savu brīvo locekli un aprakstīja katru ar savu regresijas vienādojumu. Grupām, kam neatšķīrās brīvie locekļi, aprēķināja kopēju brīvo locekli un aprakstīja ar vienu kopēju regresijas vienādojumu. Virziena koeficients visām grupām palika kopējs. Pārbaudīja brīvo locekļu un virziena koeficienta būtiskumu un aprēķināja 95% reprezentācijas zonu (sk. 6. att.).

Turpretī, ja diskrētā faktora “Diagnozes” ietekme ( $b_0$  koeficienti starp slimnieku klasēm neatšķiras- līknes pārklājas) nebija būtiska, klasiskās kovariācijas analīzes modeli aizstāja ar vienkāršu regresiju (visām trim slimnieku klasēm kopējs gan neatkarīgais  $b_0$ , gan virziena  $b_1$  koeficients), kur pacientu grupas tika apvienotas vienā grupā un aprakstītas ar vienu regresijas vienādojumu (vienu taisni, plakni vai hiperplakni atkarībā no būtisko nepārtraukto neatkarīgo faktoru skaita). Ja neatkarīgo nepārtraukto faktoru ietekme bija būtiska vai izpaudās ietekmes tendence, spēkā palika šī iepriekš minētā vienkāršā regresija. Turpretī, ja neatkarīgo nepārtraukto faktoru ietekme nebija būtiska, var apgalvot, ka mūsu pētīto atkarīgo faktoru neietekmē ne diskrētais faktors (“Diagnoze”), ne neviens no neatkarīgajiem nepārtrauktajiem faktoriem 360.-376. lpp. [550] 266.-293. lpp. [301] (sk. 6. att.).

Ja analizējot klasiskās kovariācijas analīzes modeli, atklājās, ka neatkarīgo nepārtraukto faktoru (kopējie virziena koeficienti  $b_1$ ,  $b_2$  utt. nebija būtiski) ietekmes uz atkarīgo faktoru nebija būtiskas, kā arī neizpaudās ietekmes tendence, klasiskās kovariācijas analīzes modeli aizstāja ar dispersijas analīzes modeli (analysis of variance- ANOVA). Šai modelī analizē tikai neatkarīgā diskrētā faktora (“Diagnoze”) ietekmi uz atkarīgo faktoru.

Ja diskrētā faktora ietekme bija būtiska, vai izpauda ietekmes tendenci, ar *Nūmana- Keuela* testu noskaidroja, starp kurām kategoriskā faktora klasēm (“Vesēlie”, “HOPS”, “Astma”) ir būtiskas atšķirības, un aprēķināja vidējos aritmētiskos un vidējo aritmētisko 95% reprezentācijas intervālu 360.-376. lpp. [550] 266.-293. lpp. [301] (sk. 6. att.).

Turpretī, ja neatkarīgā diskrētā faktoru ietekme nebija būtiska, var apgalvot, ka mūsu pētīto atkarīgo faktoru neietekmē ne diskrētais faktors (“Diagnoze”), ne neviena no pētītajiem neatkarīgajiem nepārtrauktajiem faktoriem 360.-376. lpp. [550] 266.-293. lpp. [301] (sk. 6. att.).

Bez tam, ja modelis ietvēra vairāk par vienu neatkarīgo nepārtraukto kvantitatīvo faktoru, tika pārbaudīts, vai nav savstarpēja korelācija starp nepārtrauktajiem neatkarīgajiem faktoriem, kas iekļauti vienā modelī (multicollinearity vai intercorrelation, vai non - orthogonality). Ja tika novērota būtiska savstarpēja korelācija starp neatkarīgajiem faktoriem, veidoja divus vai vairāk atsevišķus modeļus, kurā katrā bija tikai viens no savstarpēji saistītajiem neatkarīgajiem faktoriem 425.-426. lpp. [550].

Ja kāda atkarīgā faktora variante  $Y_i$  modelī atradās trīs standartnoviržu attālumā no teorētiski aprēķinātās  $\hat{Y}_i$ , šīs variātes tika uzskatītas par rupju kļūdu, izslēgtas no aprēķiniem un aprēķini atkārtoti bez šīm variantēm [301, 550].

## 8.2. Datu transformācija

Tā kā bioloģiskās sistēmās reti sakarības starp faktoriem ir lineāras, kā arī lai veiktu visas iepriekš minētās statistiskās analīzes, kas pieder pie parametrisko statistikas metožu grupas, ir prasības, lai atkarīgā faktora (Y) dati atbilstu normālajam sadalījumam, būtu ar līdžīgu dispersiju (homoscedastic) un neatkarīgo faktoru (X) ietekme uz atkarīgo (Y) būtu pieskaitoša (additive) 170. lpp. [301], 273, 353. lpp. [550]. Ja kāds vai visi šie nosacījumi neizpildās, nepieciešama atkarīgā faktora (Y) datu transformācija. Pārsvarā gadījumu, izpildot vienu no šiem nosacījumiem, izpildās arī pārējie nosacījumi un līkne vai plakne kļūst lineāra- iztaisnojas 353. lpp. [550]. Turpretī, ja atkarīgā faktora (Y) dati jau atbilst iepriekš minētajiem nosacījumiem un nav jātransformē vai arī pēc transformācijas un iepriekš minēto prasību izpildes dati labāk atbilst nelineārai sakarībai (līkne, vai izliekta plakne), var veikt arī neatkarīgo faktoru datu transformāciju, kas linearizē vienādojumu, bet nemaina normalitāti un abus pārējos nosacījumus 353. lpp. [550].

Lai pārbaudītu atkarīgā faktora (Y) datu normalitāti, homoscedastitāti un aditivitāti, tika vērtēta Y atlikuma (atlikums- residuals,  $atlikums = Y_i - \hat{Y}_i$  kur  $\hat{Y}_i$  - aprēķināts pēc modeļa vienādojuma,  $Y_i$  - reālais izmērītais) dati, to histogramma, un Y atlikuma atkarība no X.

Atkarīgā faktora (Y) atlikuma datu atbilstība normālajam sadalījumam tika vērtēta parametriski, izmantojot asimetrijas (Skewnes) un ekscesa (Kurtosis) rādītājus un aprēķinot  $K^2$  rādītāju pēc D'Agostīno un Pīrsona 1973. gadā izstrādātās metodes, kur  $K^2$  būtiskumu pārbauda, izmantojot  $\chi^2$  sadalījumu 67.- 69., 71., 87.- 88., 115.-119. lpp. [550]. Bez tam Y atlikuma datu normalitāte tika vērtēta arī vizuāli pēc histogrammas.

Atkarīgā faktora (Y) atlikuma datu dispersiju līdzīgumu (homoscedasticity) vērtēja vizuāli pēc grafika, kur atkarīgā faktora (Y) atlikums mainās atkarībā no neatkarīgā faktora (X). Homoscedastitātes gadījumā, palielinoties X vērtībai, palielinās arī Y izkliede, pēc Drapers un Smits 1981. 356.- 357. lpp. [550]. Bez tam, ja modelī bija iekļauts diskrētais faktors, homoscedastitāte tika vērtēta, izmantojot Bārtleta 1937. gadā izstrādāto Nagasenkerā 1984. gadā modificēto testu, kur  $B_c$  koeficienta būtiskumu pārbauda, izmantojot  $\chi^2$  sadalījumu 202.- 204. lpp. [301, 550].

### 8.2.1. Logaritmiskā transformācija

Logaritmiskās transformācijas vienādojums attēlots 3. formulā. Atkarīgā faktora (Y) logaritmiskā transformācija tika lietota atlikuma datu dispersiju atšķirīguma gadījumā (heteroscedasticity), ja faktora atlikuma datu standartnovirze palielinājās proporcionāli neatkarīgā faktora (X) vērtībām 354. lpp. [550], vai dispersijas analīzes gadījumā katras klases vidējā aritmētiskā standartnovirze proporcionāla šās klases vidējam aritmētiskajam (variācijas koeficienti s% klasēm ir līdzīgi) 275. lpp. [550], ja neatkarīgā faktora ietekme uz atkarīgo faktoru ir multiplikatīva, nevis aditīva 275. lpp. [550], ja atkarīgā faktora (Y) atlikuma dati neatbilda normālajam sadalījumam, bet bija stipri pozitīvi asimetriski (positively skewed distribution) 275. lpp. [301, 550].

**3. formula:**  $Y' = \log_{10} Y$ .

Ja Y vērtības ir mazi skaitļi un īpaši ja dažas vērtības ir vienādas ar nulli, tika lietota Bārtleta 1947. gadā ieteiktā sakarība (sk. 4. formulu) [301, 550].

**4. formula:**  $Y' = \log_{10}(Y + 1)$ .

Pēc statistiskās analīzes veikšanas regresijas vienādojumiem, to 95% reprezentācijas zonām, dispersijas analīžu klašu vidējiem aritmētiskajiem un to 95% reprezentācijas intervāliem veica pretēju transformāciju (sk. 5.un 6. formulu) 275. lpp. [301, 550].

**5. formula:**  $Y = 10^{Y'}$ .

**6. formula:**  $Y = 10^{Y'} - 1$ .

Ja logaritmiski ticis transformēts tikai atkarīgais faktors (Y) par  $Y'$ , kovariācijas vai regresijas analīzes gaitā iegūtos taisnes vienādojumus (vai analogiski plaknes vai hiperplaknes vienādojumus) (sk. 9. formulu) transformējot atpakaļ, iegūst **eksponentregresijas vienādojumus** (sk. 7. formulu) 246. lpp. [301].

**7. formula.** Eksponentregresija:  $Y = b_0 b_1^X$ .

Šo vienādojumu logaritmējot, iegūst lineāru sakarību (sk. 8. formulu).

**8. formula:**  $\log_{10} Y = \log_{10} b_0 + X \log_{10} b_1$ .

Ja apzīmē  $Y' = \log_{10} Y$ ,  $b'_0 = \log_{10} b_0$ ,  $b'_1 = \log_{10} b_1$ , iegūst taisnes vienādojumu (sk. 9. formulu)

**9. formula:**  $Y' = b'_0 + b'_1 X$ .

Taisnes vienādojuma koeficientus iegūst iepriekš minētās analīzēs. Veicot atgriezenisku transformāciju  $b'_0$  koeficientam ( $b_0 = 10^{b'_0}$ ) un  $b'_1$  koeficientam ( $b_1 = 10^{b'_1}$ ) un ievietojot abus šos koeficientus 7. formulā, iegūst eksponentregresijas vienādojumu [301].

Ja logaritmiski tika transformēts gan atkarīgais faktors (Y), gan neatkarīgais faktors (X) par attiecīgi ( $Y'$ ) un ( $X'$ ), kovariācijas vai regresijas analīzēs iegūtos taisnes vienādojumus (vai analogiski plaknes vai hiperplaknes vienādojumus) transformējot atpakaļ, iegūst **pakāpes regresijas vienādojumus** (sk. 10. formulu) 245. lpp. [301].

**10. formula.** Pakāpes regresijas vienādojums:  $Y = b_0 X^{b_1}$ .

Šo vienādojumu logaritmējot, iegūst lineāru sakarību (sk. 11. formulu).

**11. formula:**  $\log_{10} Y = \log_{10} b_0 + b_1 \log_{10} X$ .

Ja apzīmē  $Y' = \log_{10} Y$ ,  $b'_0 = \log_{10} b_0$ ,  $X' = \log_{10} X$ , iegūst taisnes vienādojumu (sk. 12. formulu).

**12. formula:**  $Y' = b'_0 + b_1 X'$ .

Taisnes vienādojuma koeficientus iegūst iepriekš minētās analīzēs. Veicot atgriezenisku transformāciju  $b'_0$  koeficientam ( $b_0 = 10^{b'_0}$ ) un ievietojot  $b_0$  un  $b_1$  koeficientu 10. formulā, iegūst pakāpes regresijas vienādojumu 245. lpp. [301].

Līdzīgi rīkojas arī daudzfaktoru **multiplās pakāpes regresijas** gadījumā (vairāki neatkarīgie faktori  $X_1, X_2, \dots, X_k$ ), lietojot Koba-Duglasi funkciju (sk. 13. formulu) 264. lpp. [301].

$$\mathbf{13. formula: } Y = b_0 X_1^{b_1} X_2^{b_2} \dots X_k^{b_k} .$$

Pēc tam šo vienādojumu logaritmējot, iegūst lineāru sakarību, tāpat kā iepriekš aprakstīts.

Ja logaritmiski ticis transformēts tikai neatkarīgais faktors (X) par  $X'$ , kovariācijas vai regresijas analīzēs iegūtos taisnes vienādojumus (vai analogiski plaknes vai hiperplaknes vienādojumus) (sk. 15. formulu) transformējot atpakaļ, iegūst **logaritmiskās regresijas vienādojumus** (sk. 14. formulu) 249. lpp. [301].

$$\mathbf{14. formula: } Y = b_0 + b_1 \log_{10} X .$$

Ja apzīmē ar  $X' = \log_{10} X$ , iegūst taisnes vienādojumu (sk. 15. formulu).

$$\mathbf{15. formula: } Y = b_0 + b_1 X' .$$

Taisnes vienādojuma koeficientus iegūst iepriekš minētās analīzēs. Ievietojot  $b_0$  un  $b_1$  koeficientu 14. formulā, iegūst logaritmiskās regresijas vienādojumu.

### 8.2.2. Kvadrātsaknes transformācija

Kvadrātsaknes transformācijas vienādojums attēlots 16. formulā. Atkarīgā faktora (Y) kvadrātsaknes transformācija tika lietota atlikuma datu dispersiju atšķirīguma gadījumā (heteroscedasticity), ja faktora atlikuma datu dispersija palielinājās proporcionāli neatkarīgā faktora (X) vērtībām 353. lpp. [550], vai dispersijas analīzes gadījumā- katras klases vidējā aritmētiskā dispersija proporcionāla šās klases vidējam aritmētiskajam 275. lpp. [550], ja atkarīgā faktora (Y) atlikuma dati neatbilda normālajam sadalījumam, bet atbilda Puasona sadalījumam (dati iegūti objektu vai notikumu uzskaitē, neliela asimetrija) 275. lpp. [550] 172-174. lpp. [301].

$$\mathbf{16. formula: } Y' = \sqrt{Y} .$$

Ja Y vērtības ir mazi skaitļi un īpaši ja dažas vērtības ir vienādas ar nulli, tika lietota Bārtleta 1936. gadā ieteiktā sakarību (sk. 17. formulu) [301, 550].

$$\mathbf{17. formula: } Y' = \sqrt{Y + 0,5} .$$

Pēc statistiskās analīzes veikšanas regresijas vienādojumiem, to 95% reprezentācijas zonām, dispersijas analīžu klašu vidējiem aritmētiskajiem un to 95% reprezentācijas intervāliem veica pretēju transformāciju (sk. 18. un 19. formulu) 276. lpp. [301, 550].



**18. formula:**  $Y = Y'^2$ .

**19. formula:**  $Y = Y'^2 - 0,5$ .

Ja kvadrātsaknes transformācija tika veikta atkarīgajam faktoram (Y), transformējot par Y', kovariācijas vai regresijas analīzēs iegūtos taisnes vienādojumus (vai analogiski plaknes vai hiperplaknes vienādojumus) (sk. 20. formulu) transformējot atpakaļ, ieguva **otrās pakāpes paraboliskas regresijas vienādojumus** (sk. 22. formulu) 235. lpp. [301].

**20. formula:**  $Y' = b'_0 + b'_1 X$  kur  $Y' = \sqrt{Y}$ .

**21. formula:**  $Y = (b'_0 + b'_1 X)^2 = b_0'^2 + 2b_0' b_1' X + b_1'^2 X^2$ .

**22. formula:**  $Y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2$ , kur  $b_0 = b_0'^2$ ,  $b_1 = 2b_0' b_1'$ ,  $b_2 = b_1'^2$ .

Ja kvadrātsaknes transformācija tika veikta neatkarīgajam faktoram (X), transformējot par X', kovariācijas vai regresijas analīzēs iegūtos taisnes vienādojumus (sk. 23. formulu) X', vietā ievietojot  $\sqrt{X}$ , ieguva **kvadrātsaknes regresijas vienādojumu** (sk. 24. formulu).

**23. formula:**  $Y = b_0 + b_1 X'$ , kur  $X' = \sqrt{X}$ .

**24. formula:**  $Y = b_0 + b_1 \sqrt{X}$ .

### 8.2.3. Arksinusa transformācija

Arksinusa transformācijas vienādojumi attēloti 25. un 26. formulā. Atkarīgā faktora (Y) arksinusa transformācija tika elietota, ja atkarīgā faktora dati atbilda binomiālajam sadalījumam. Pēc statistikas teorijas, ja dati iegūti kā proporcija robežās no 0 līdz 1 vai izteikti procentos robežās no 0% līdz 100%, tie pārsvarā atbilst binomiālajam nekā normālajam sadalījumam 170,-174. lpp. [301] 278., 353. lpp. [550]. Šī nvirze no normalitātes ir lielāka mazu un lielu procentu gadījumā (no 0% līdz 30% un no 70% līdz 100%) 278. lpp. [550].

**25. formula:**  $Y' = \arcsin \sqrt{Y}$  proporcijai no 0 līdz 1.

**26. formula:**  $Y' = \arcsin \sqrt{\frac{Y}{100}}$  proporcijai no 0% līdz 100%.

Pēc statistiskās analīzes veikšanas regresijas vienādojumiem, to 95% reprezentācijas zonām, dispersijas analīžu klašu vidējiem aritmētiskajiem un to 95% reprezentācijas intervāliem veica pretēju transformāciju (sk. 27. un 28. formulu) 278. lpp. [550].

**27. formula:**  $Y = (\sin Y')^2$  proporcijai no 0 līdz 1.

**28. formula:**  $Y = 100(\sin Y')^2$  proporcijai no 0% līdz 100%.

Attiecīgi, ja iegūtais taisnes vienādojums ir

**29. formula:**  $Y' = b'_0 + b'_1 X$ ,

tad, transformējot atpakaļ, iegūst **sinusa regresijas vienādojumu** (sk. 30. formulu).

**30. formula:**  $Y = 100(\sin(b'_0 + b'_1 X))^2$ .

**Pēc statistiskās analīzes un transformācijas veikšanas** atkal tika pārbaudīta atkarīgā faktora (Y) atlikuma datu normalitāte, homoscedastitāte un aditivitāte. Ja konkrētā transformācija bija nepietiekama, tā tika aizstāta ar citu, stiprāku (piemēram, arksinusa vai kvadrātsaknes transformāciju aizstāja ar logaritmisko), vai ja transformācija bija par stipru- sadalījums kļuva pretēji asimetrisks vai ekscess pretējs - izmantoja vājāku transformāciju (piemēram, logaritmisko transformāciju aizstāja ar kvadrātsaknes transformāciju) un statistisko analīzi atkārtoja 356. lpp. [550].

## Rezultāti

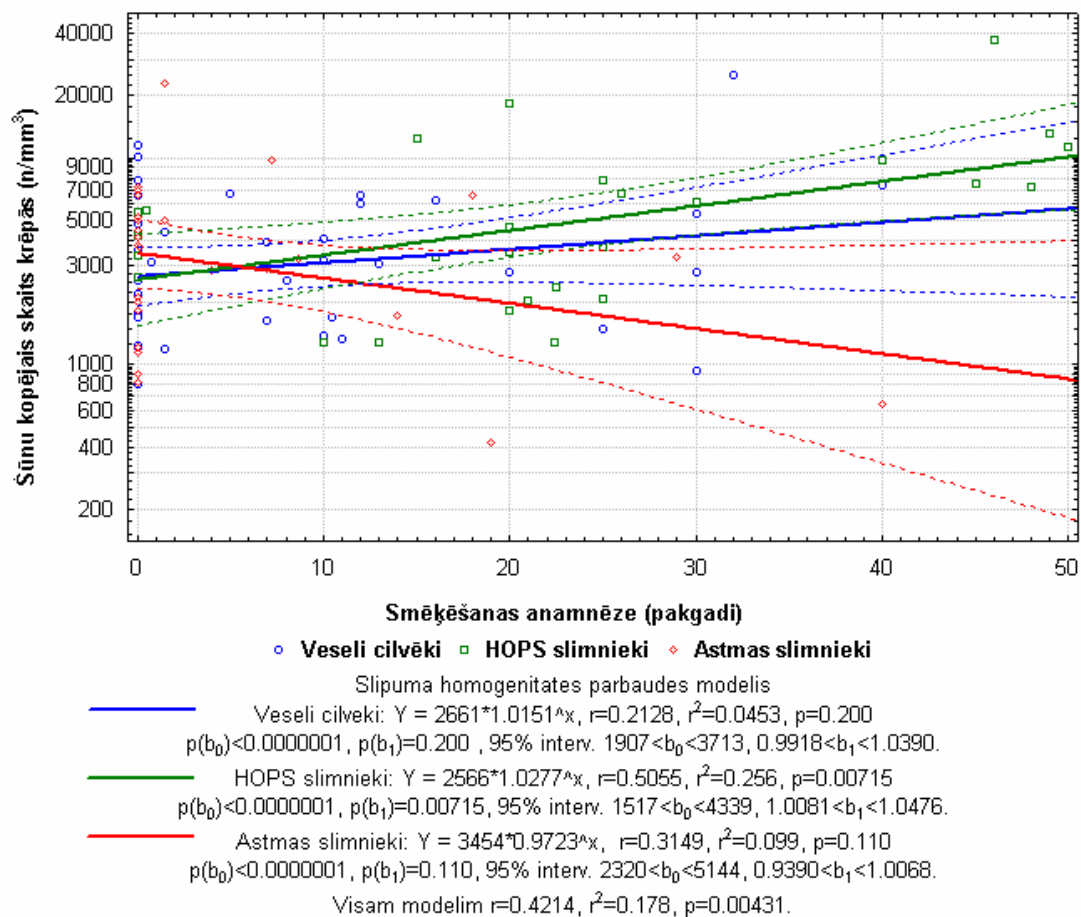
### 1. Citoloģiskie raksturlielumi

#### 1.1. Smēķēšanas izraisītās pārmaiņas krēpu citoloģiskajos raksturlielumos

##### 1.1.1. Kopējais šūnu skaits krēpās

Veseliem cilvēkiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski neietekmēja kopējo šūnu skaitu ierosinātās krēpās (sk. 7. att. zilie  $p=0,200$ ).

HOPS slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums kopējo šūnu skaitu ierosinātās krēpās palielināja būtiski (sk. 7. att. zaļie  $p=0,00715$ ).



7. attēls. Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz kopējo šūnu skaitu ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem. Divfaktoru eksponenciālās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

**Bronhiālās astmas** slimniekiem, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam,

novēroja šūnu kopējā skaita mazināšanos ierosinātās krēpās, kaut gan tas nebija statistiski ticams (sk. 7. att. sarkanie  $p=0,1097$ ).

Izmantojot divfaktoru EKASHP modeli, neizdevās atrast būtiskas atšķirības kopējā šūnu skaitā ierosinātās krēpās starp visu grupu smēķētājiem ar mazu stāžu (sk. 7. att.  $b_0$  koeficientu atšķirības starp grupām ir nebūtiskas- līkņu augstums pie 0 pakgadiem būtiski neatšķiras). Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz kopējo šūnu skaitu ( $b_1$  koeficienti) veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupā būtiski neatšķīrās ( $p=0,408$ ), turpretī veselu cilvēku un astmas slimnieku grupā  $p=0,0349$ , kā arī HOPS un astmas slimnieku grupā ( $p=0,00472$ ) novēroja būtiskas atšķirības: ja veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem tas pieauga, tad astmas slimniekiem šūnu kopējam skaitam krēpās bija tendence mazināties (sk. 7.att. zilā, zaļā un sarkanā līnija).

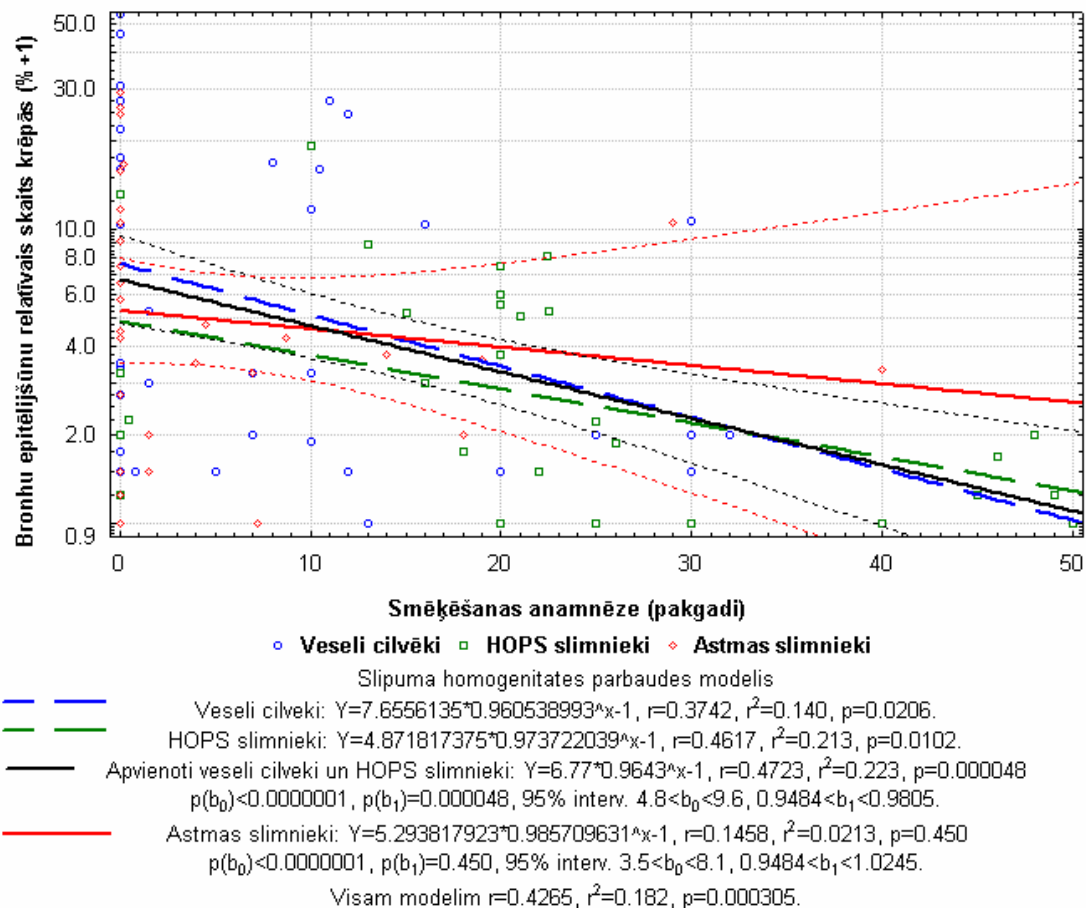
## 1.1.2. Bronhu epitēlijs

### 1.1.2.1. Relatīvais bronhu epitēlijšūnu skaits krēpās

Gan **veseliem** cilvēkiem, gan **HOPS** slimniekiem novēroja būtisku bronhu epitēlija relatīvā šūnu skaita mazināšanos ierosinātās krēpās mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 8. att. zila  $p=0,0206$  un zaļa  $p=0,0102$  pārtraukta līnija). Tā kā, izmantojot divfaktoru EKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku regresijas vienādojumiem (gan  $b_0$  koeficienti neatšķīrās  $p=0,253$ , gan  $b_1$  koeficienti neatšķīrās  $p=0,479$ ), kā arī abas regresijas bija ar līdzīgu ticamību, matemātiski abas šīs grupas var apvienot vienā grupā (apvienotā veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupā) un aprakstīt ar vienu regresijas vienādojumu ar augstu ticamību ( $p=0,000048$ ; sk. 8. att. melnā nepārtrauktā līnija).

**Bronhiālās astmas** slimniekiem netika novērota būtiska mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz bronhiālā epitēlija relatīvo šūnu skaitu krēpās (sk. 8. att. sarkanie  $p=0,450$ ).

Izmantojot divfaktoru EKASHP modeli, neizdevās atrast būtiskas atšķirības bronhu epitēlija relatīvā šūnu skaitā starp astmas slimniekiem un apvienoto veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu smēķētājiem ar mazu stāžu ( $b_0$  koeficientu atšķirība starp grupām bija nebūtiska  $p=0,368$ ). Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz bronhu epitēlija relatīvo šūnu skaitu ( $b_1$  koeficienti) starp astmas slimnieku un apvienoto veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu būtiski neatšķīrās  $p=0,292$ .

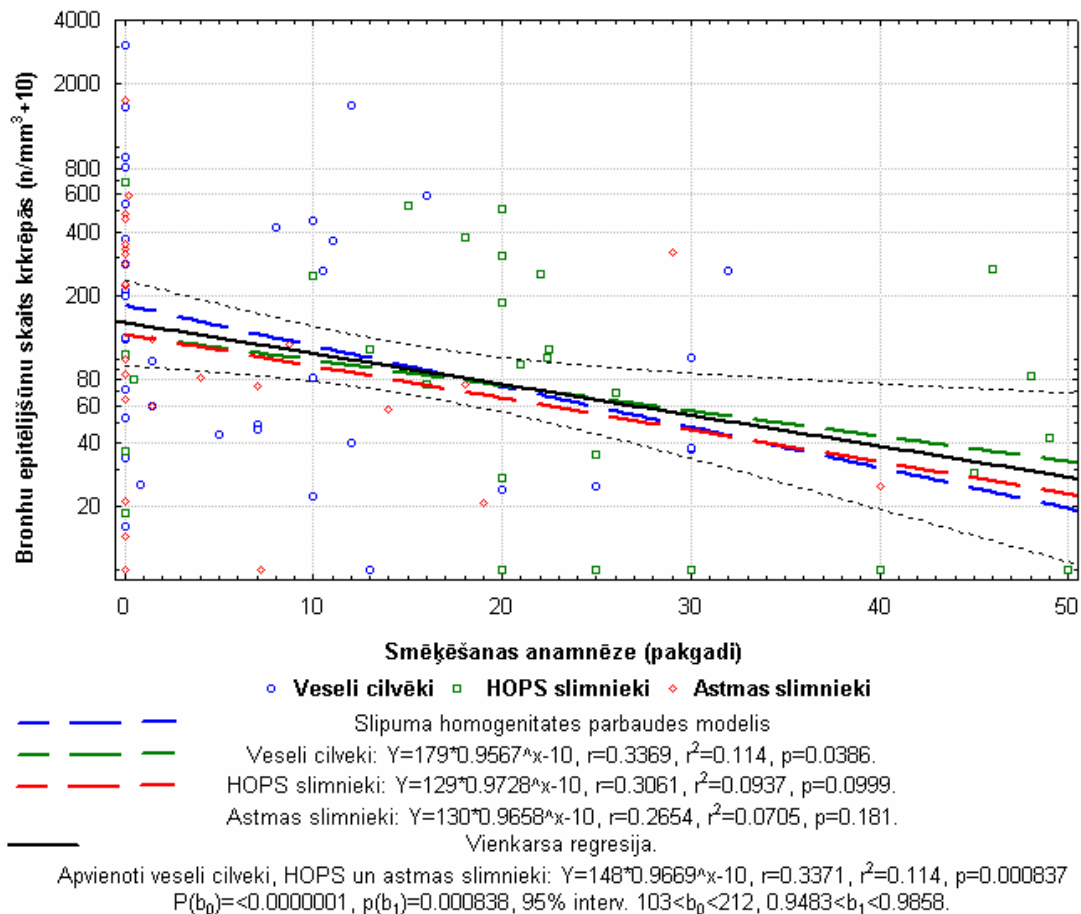


**8. attēls. Smēķēšanas ietekme uz bronhu epitēlijšūnu relatīvo skaitu ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem kopā apvienotiem.** Tā kā vairāku datu vērtība bija 0, lai datus varētu attēlot logaritmiskajā skalā, visiem bronhu epitēlijšūnu relatīvā skaita punktiem, kā arī līknēm, kas redzami grafikā, pieskaitīts 1. Vienādojumi aprakstīti bez vieninieka pieskaitīšanas. Ar pārtrauktām līnijām apzīmētas veselu cilvēku un HOPS slimnieku grupa pirms apvienošanas, ar nepārtrauktām līnijām - izveidotais divfaktoru eksponentiālais kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

### 1.1.2.2. Absolūtais bronhu epitēlijšūnu skaits krēpās

Gan veseliem cilvēkiem, gan HOPS, gan bronhiālās astmas slimniekiem konstatēja bronhu epitēlijšūnu absolūtā skaita mazināšanos ierosinātās krēpās mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 9. att. zilā, zaļā un sarkanā pārtrauktā līnija, attiecīgi  $p=0,0386$ ,  $p=0,0999$  un  $p=0,181$ ). Tā kā, izmantojot divfaktoru EKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēku HOPS un astmas slimnieku grupas regresijas vienādojumiem (gan  $b_0$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,698$ , gan  $b_1$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,813$ ), kā arī regresijas bija ar līdzīgu ticamību (visām grupām  $p < 0,2$ ), visas šīs grupas matemātiski var apvienot vienā grupā

(apvienotā veselo cilvēku HOPS un astmas slimnieku grupā), aprakstīt ar vienu regresijas vienādojumu ar augstu ticamību  $p=0,000837$  (sk. 9. att. melna nepārtraukta līnija) un apgalvot, ka bronhu epitēliju skaits ierosinātās krēpās, palielinoties smēķēšanas stāžam, būtiski mazinās neatkarīgi no slimības.



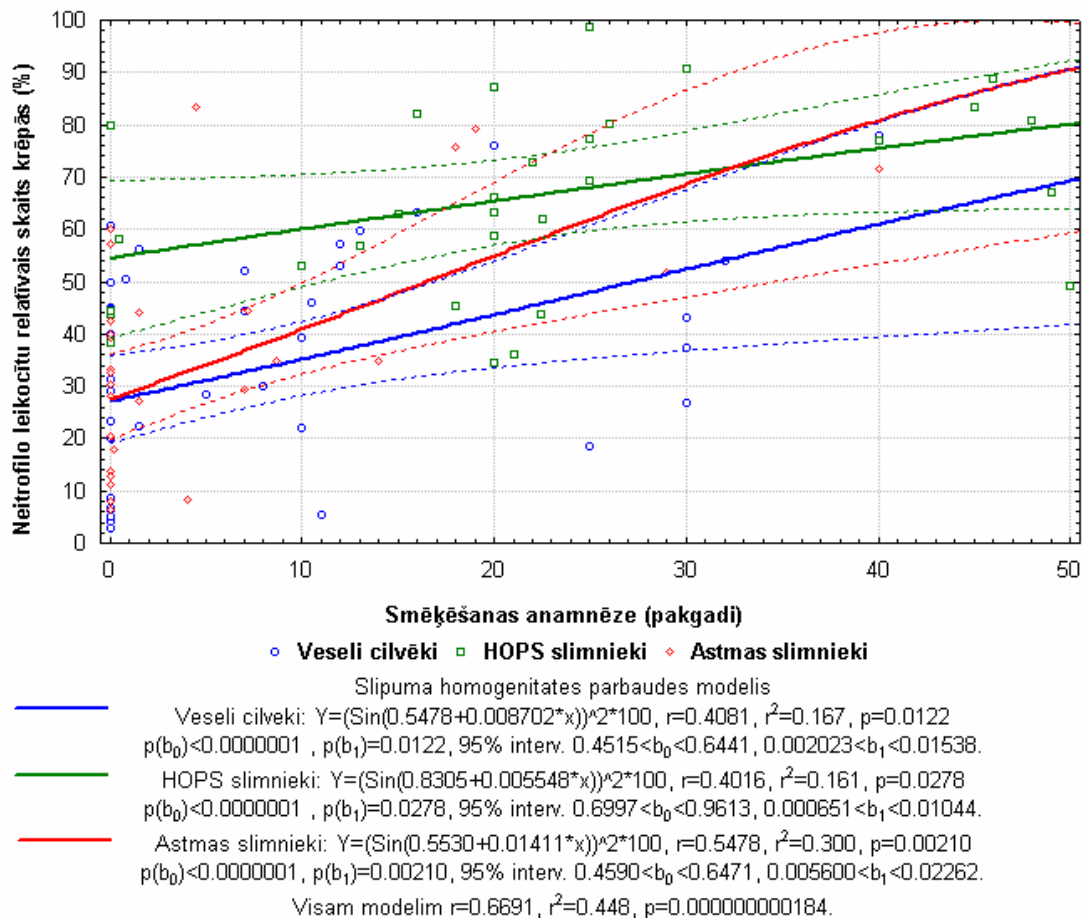
**9. attēls. Smēķēšanas ietekme uz bronhu epitēliju skaitu ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī visām trim grupām kopā.** Tā kā vairāku datu vērtība bija 0, lai datus varētu attēlot logaritmiskajā skalā, visiem bronhu epitēliju skaita punktiem, kā arī līknēm, kas redzami grafikā, pieskaitīts 10. Vienādojumi aprakstīti bez 10 pieskaitīšanas. Ar pārtrauktām līnijām apzīmēts divfaktoru eksponenciālās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis, ar nepārtrauktām līnijām - vienkārša regresija visām trim grupām kopā. Ar punktētām līnijām apzīmēta regresijas 95% reprezentācijas zona.

### 1.1.3. Neitrofile leukocīti krēpās

#### 1.1.3.1. Relatīvais neitrofilo leukocītu skaits krēpās

Gan veseliem cilvēkiem, gan HOPS, gan bronhiālās astmas slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski palielināja neitrofilo leukocītu relatīvo skaitu ierosinātās krēpās (sk. 10. att. zilie, zaļie un sarkanie, attiecīgi  $p=0,0122$ ,  $p=0,0278$  un  $p=0,00210$ ).

Izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, tika konstatēts, ka neitrofilo leukocītu relatīvais skaits HOPS slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu ir būtiski palielināts, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem ar mazu smēķēšanas stāžu ( $p=0,00117$ ), kā arī salīdzinot ar bronhiālās astmas slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu, par ko liecina  $b_0$  koeficientu atšķirības starp šīm grupām ( $p=0,00110$ ), turpretim starp veseliem cilvēkiem ar mazu smēķēšanas stāžu un astmas slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu netika novērota būtiska atšķirība ( $p=0,940$ ) (sk. 10. att. līknes pie 0 pakgadiem).



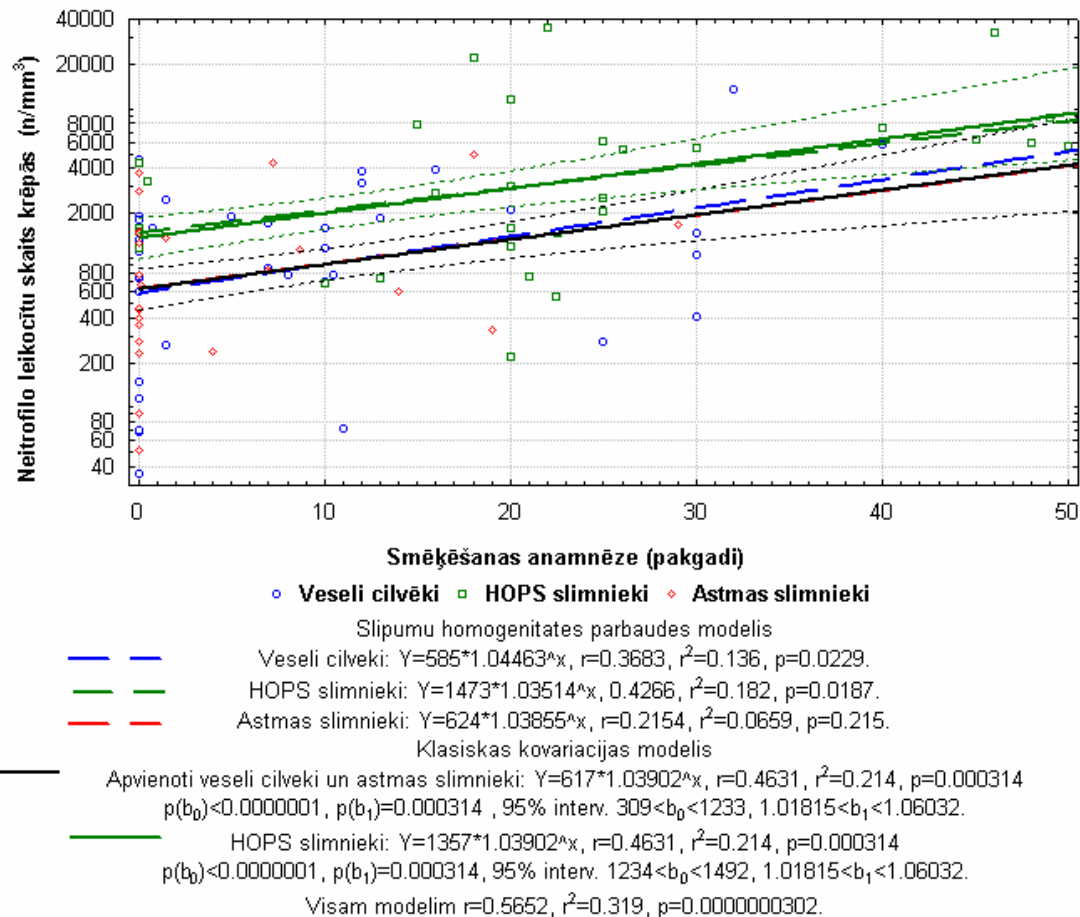
**10. attēls. Smēķēšanas ietekme uz neitrofilo leukocītu relatīvo skaitu ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Divfaktoru sinusa kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē gan veseliem cilvēkiem, gan HOPS slimniekiem (zilā un zaļā līkne 10. att.) līdzīgi pieaug neitrofilo leukocītu relatīvais skaits, uz ko norāda, nebūtiskā atšķirība starp smēķēšanas ietekmi (starp  $b_1$  koeficientiem abās grupās  $p=0,440$ ), lai gan HOPS slimniekiem tas saglabājās augstākā līmenī (zaļā līkne augstāk par zilo, sk. 10. att.). Visstraujāko neitrofilo leukocītu relatīvā skaita pieaugumu izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē novēroja bronhiālās astmas slimniekiem, kur šim pieaugumam ir tendence būt straujākam nekā

HOPS slimniekiem ( $p=0,0722$ ; sk. sarkanu un zaļu līkni 10. att.).

### 1.1.3.2. Absolūtais neitrofilo leikocītu skaits krēpās

Gan veseliem cilvēkiem, gan HOPS, gan bronhiālās astmas slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums palielināja (attiecīgi  $p=0,0229$ ,  $p=0,0187$  un  $p=0,215$ ) neitrofilo leikocītu absolūto skaitu ierosinātās krēpās (sk. 11. att. attiecīgi zilā, zaļā un sarkanā pārtrauktā līnija).



**11. attēls. Smēķēšanas ietekme uz neitrofilo leikocītu absolūto skaitu ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmēts divfaktoru eksponenciālās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis, ar nepārtrauktām līnijām - divfaktoru eksponenciālās klasiskās kovariācijas modelis, bet ar punktētām līnijām - šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Tā kā, izmantojot divfaktoru EKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēku, HOPS un astmas slimnieku grupu regresijas vienādojumu virziena koeficientiem ( $b_1$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,923$ ), divfaktoru EKASHP modeli aizstāja ar divfaktoru EKKA modeli (visām grupām aprēķina kopējo virziena koeficientu  $b_1$ ). Tā kā, izmantojot divfaktoru EKKA modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp HOPS un astmas slimnieku grupu regresijas vienādojumu brīvajiem

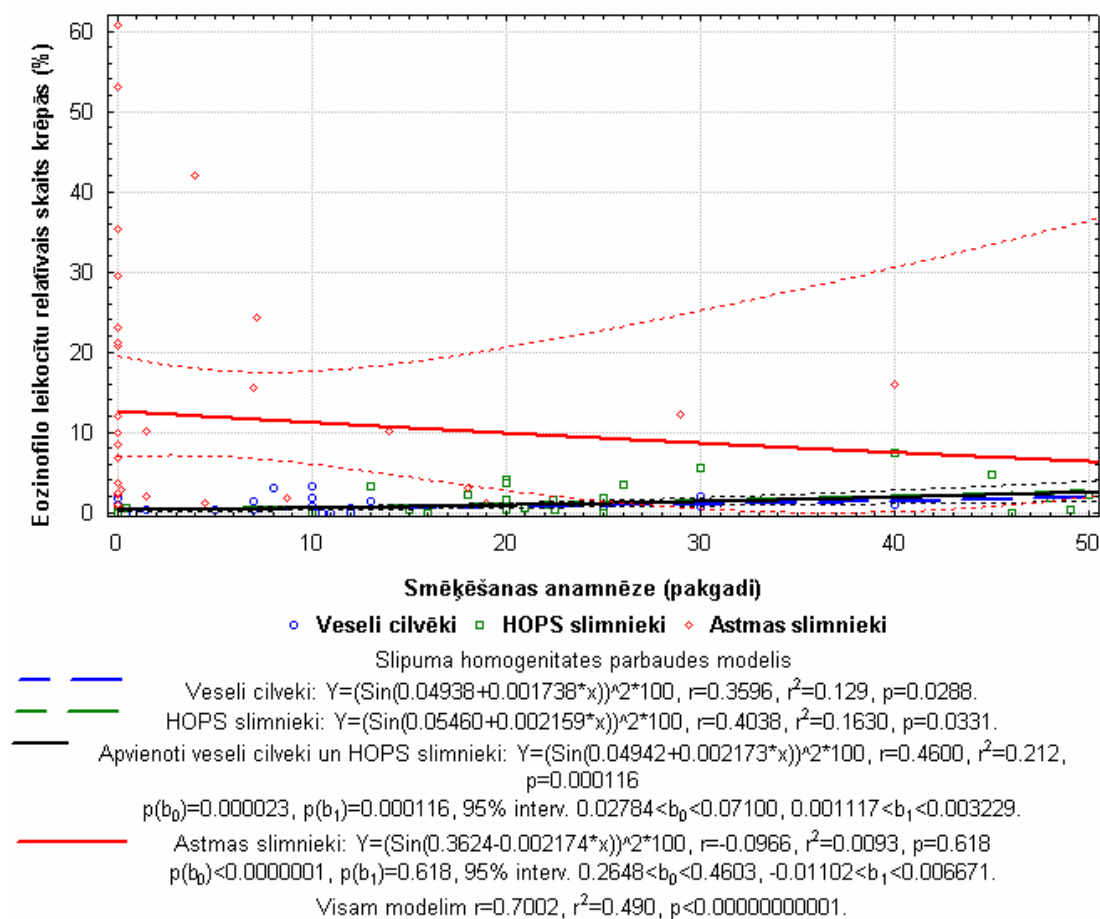


koeficientiem ( $b_0$  koeficienti būtiski neatšķīrās,  $p=0,923$ ), HOPS un astmas slimnieku grupas apvienoja vienā kopējā grupā un aprakstīja ar vienu kopēju regresijas vienādojumu (sk. 11. att., melnā nepārtrauktā līnija,  $p=0,000314$ ).

Gan **veseliem** cilvēkiem un **astmas** slimniekiem, gan **HOPS** slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski ( $p=0,000314$ ) palielināja neitrofilo leukocītu absolūto skaitu ierosinātās krēpās, bet HOPS slimniekiem jau ar mazu smēķēšanas stāžu, kā arī pieaugot nosmēķēto pakgadu skaitam neitrofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās bija būtiski lielāks ( $p=0,0103$ ) nekā veselu cilvēku un astmas slimnieku grupai (sk. 11. att., melnā un zaļā nepārtrauktā līnija).

## 1.1.4. Eozinofīlie leukocīti krēpās

### 1.1.4.1. Relatīvais eozinofīlo leukocītu skaits krēpās



**12. attēls. Smēķēšanas ietekme uz eozinofīlo leukocītu relatīvo skaitu ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī kopā apvienotiem veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmētas veselu cilvēku un HOPS slimnieku grupas pirms apvienošanas, ar nepārtrauktām līnijām - rezultātā izveidotais divfaktoru sinusa kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Gan **veseliem** cilvēkiem, gan **HOPS** slimniekiem konstatēja būtisku eozinofilo leukocītu relatīvā skaita palielināšanos ierosinātās krēpās mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 12. att., zilā un zaļā pārtrauktās līnija;  $p=0,0288$ ,  $p=0,0311$ ).

Tā kā, izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu regresijas vienādojumiem (gan  $b_0$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,834$ , gan  $b_1$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,736$ ), kā arī abas regresijas bija ar līdzīgu ticamību, abas šīs grupas tika apvienotas vienā grupā (veselu cilvēku un HOPS slimnieku) un aprakstītas ar vienu regresijas vienādojumu ar lielāku ticamību,  $p=0,000116$  (sk. 12. att., melnā nepārtrauktā līnija).

Turpretī **bronhiālās astmas** slimniekiem netika konstatēta būtiska mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz relatīvo eozinofilo leukocītu skaitu krēpās (sk. 12. att., sarkanā nepārtrauktā līnija,  $p=0,618$ ).

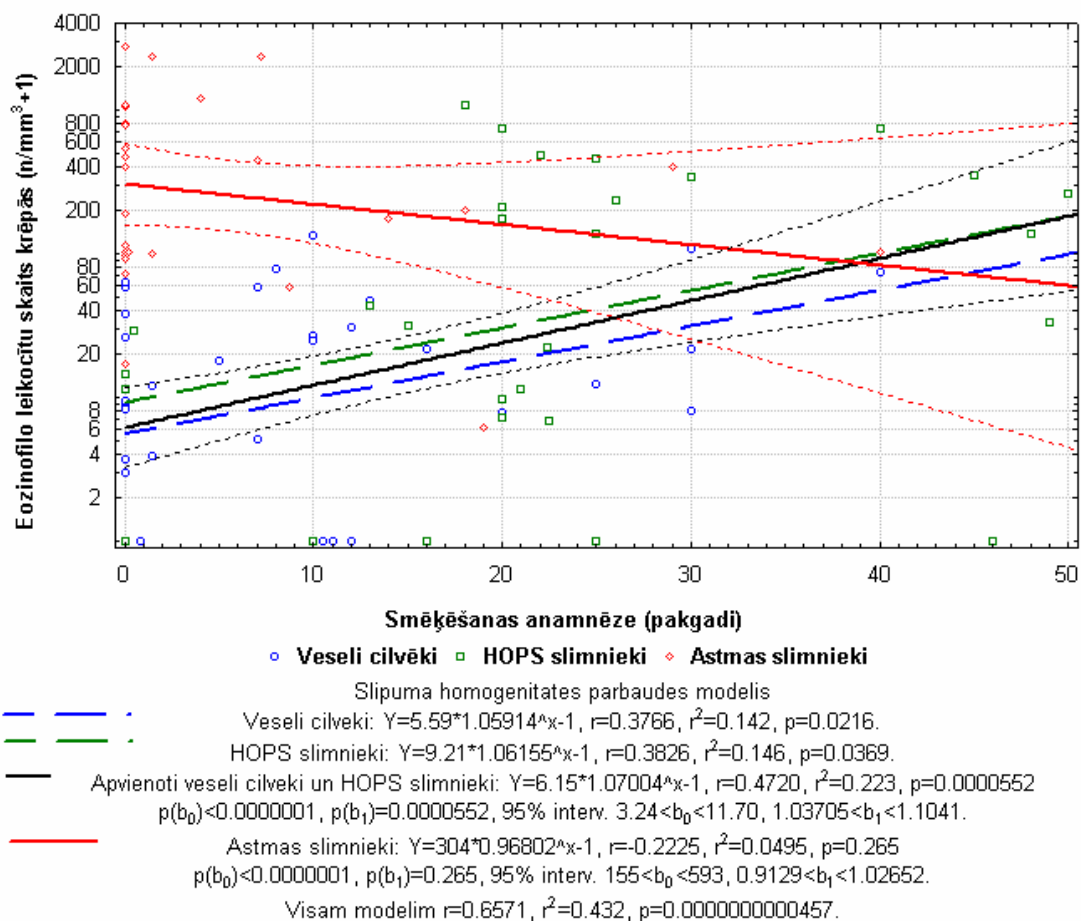
Izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, atklāja būtiski palielinātu eozinofilo leukocītu relatīvo skaitu astmas slimniekiem salīdzinājumā ar apvienoto veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu, smēķētājiem ar mazu stāžu ( $b_0$  koeficientu atšķirības starp šīm grupām,  $p<0,0000000001$ ). Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz eozinofilo leukocītu relatīvo šūnu skaitu ( $b_1$  koeficienti) starp astmas slimnieku un apvienoto veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupām atšķīrās būtiski,  $p=0,0387$ : ja astmas slimniekiem tas būtiski nemainījās, pat nedaudz kritās, tad veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupai tas būtiski pieauga.

#### **1.1.4.2. Absolūtais eozinofilo leukocītu skaits krēpās**

Gan **veseliem** cilvēkiem, gan **HOPS** slimniekiem atklāja būtisku ( $p=0,0216$ ,  $p=0,0369$ ) eozinofilo leukocītu absolūtā skaita palielināšanos ierosinātās krēpās mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 13. att., zilā un zaļā pārtrauktā līnija).

Tā kā, izmantojot divfaktoru EKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu regresijas vienādojumiem (gan  $b_0$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,496$ , gan  $b_1$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,951$ ), kā arī abas regresijas bija ar līdzīgu ticamību abas šīs grupas tika matemātiski apvienotas kopējā grupā (veselie cilvēku un HOPS slimnieki) un aprakstītas ar vienu regresijas vienādojumu ar lielāku ticamību,  $p=0,0000552$  (sk. 13. att., melna nepārtraukta līnija).

Turpretim **bronhiālās astmas** slimniekiem netika novērota būtiska mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz absolūto eozinofilo leukocītu skaitu krēpās (sk. 13. att., sarkanā nepārtrauktā līnija,  $p=0,265$ ).



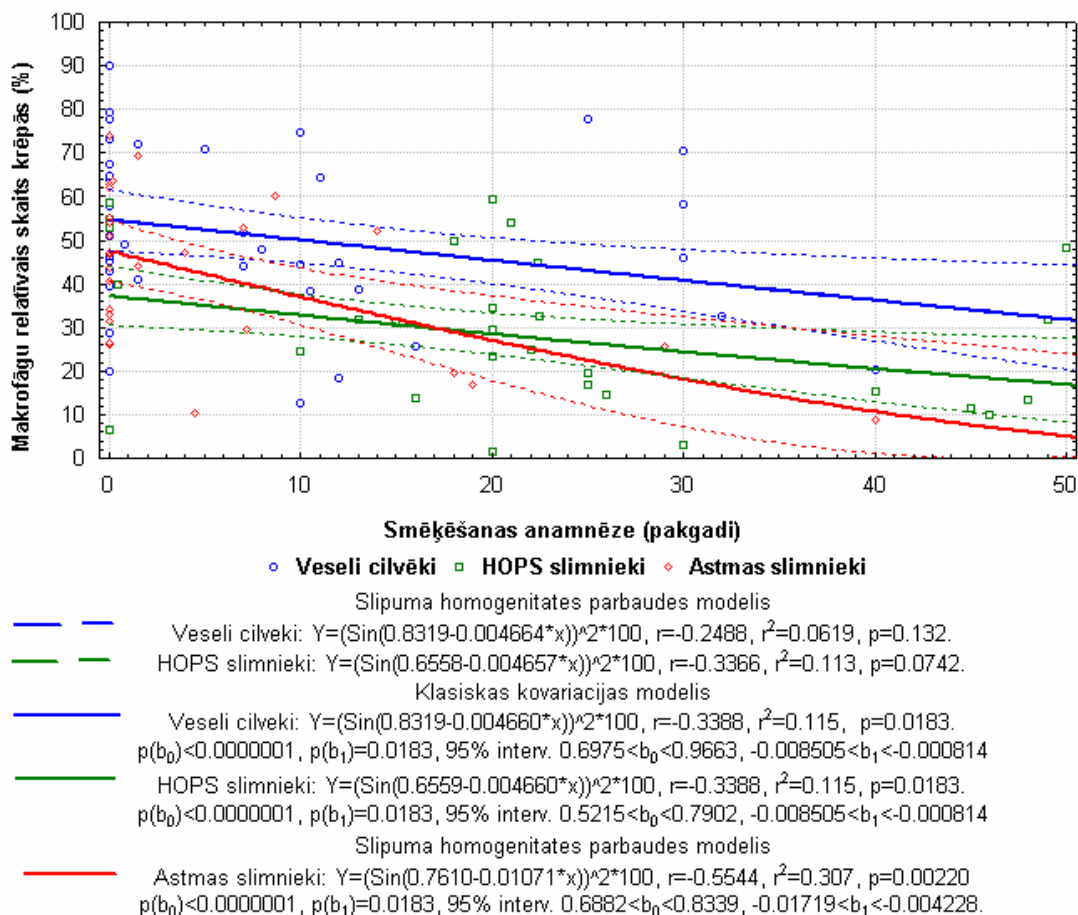
**13. attēls. Smēķēšanas ietekme uz eozinofilo leukocītu absolūto skaitu ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī kopā apvienotiem veseliem un HOPS slimniekiem.** Tā kā vairāku datu vērtība bija 0, lai datus varētu attēlot logaritmiskajā skalā, visiem eozinofilo leukocītu skaita punktiem, kā arī līknēm kas redzami grafikā, pieskaitīts 1. Vienādojumi aprakstīti bez 1 pieskaitīšanas. Ar pārtrauktām līnijām apzīmētas veselu cilvēku un HOPS slimnieku grupas pirms apvienošanas, ar nepārtrauktām līnijām - izveidotais divfaktoru eksponenciālās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Izmantojot divfaktoru EKASHP modeli, atklāja būtiski palielinātu eozinofilo leukocītu absolūto skaitu astmas slimniekiem salīdzinājumā ar apvienoto veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu, smēķētājiem ar mazu stāžu ( $b_0$  koeficientu atšķirības starp šīm grupām  $p<0,00000000001$ ). Mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz eozinofilo leukocītu absolūto skaitu ( $b_1$  koeficienti) starp astmas un apvienoto veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupām būtiski atšķīrās,  $p=0,00796$ : ja astmas slimniekiem tas būtiski nemainījās, pat nedaudz kritās, tad veselu cilvēku un HOPS slimnieku grupai eozinofilo leukocītu skaits būtiski pieauga (sk. 13. att., sarkanā un melnā nepārtrauktā līnija).

## 1.1.5. Makrofāgi krēpās

### 1.1.5.1. Relatīvais makrofāgu skaits krēpās

Tā kā, izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu regresijas vienādojumu virziena koeficientiem ( $b_1$  koeficienti būtiski neatšķīrās,  $p=0,999$ ) (sk. 14. att., zilā un zaļā pārtrauktā līnija, kas pārklājas ar nepārtrauktām, ir paralēlas), divfaktoru SKASHP modelis tika aizstāts ar divfaktoru SKKA modeli (abām grupām aprēķina kopēju virziena koeficientu  $b_1$ , sk. 14. att., zilā un zaļā nepārtrauktā līnija).



**14. attēls. Smēķēšanas ietekme uz makrofāgu relatīvo skaitu ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmēts divfaktoru sinusa kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis, ar nepārtrauktām līnijām - divfaktoru sinusa klasiskās kovariācijas analīzes modelis, bet ar punktētām līnijām - šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Gan **veseliem** cilvēkiem, gan **HOPS** slimniekiem līdzīgi mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski ( $p=0,0183$ ) mazināja makrofāgu relatīvo skaitu ierosinātās krēpās, tomēr **HOPS** slimniekiem jau ar mazu smēķēšanas stāžu, kā arī pieaugot

nosmēķēto pakgadu skaitam makrofāgu relatīvais skaits ierosinātās krēpās bija ticami mazāks ( $p=0,0103$ ) nekā veselo cilvēku grupā (sk. 14. att., zilā un zaļā nepārtrauktā līnija).

Tāpat kā veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem, arī **bronhiālās astmas** slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski ( $p=0,00220$ ) mazināja makrofāgu relatīvo skaitu ierosinātās krēpās, turklāt staujāk nekā veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupai, lai gan šī atšķirība, izmantojot divfaktoru SKASHP modeli nabija būtiska,  $p=0,137$  (sk. 14. att., sarkanā nepārtrauktā līnija). Astmas slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu makrofāgu relatīvais skaits ierosinātās krēpās būtiski neatšķīrās no veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupām.

### 1.1.5.2. Absolūtais makrofāgu skaits krēpās

Ne **veseliem** cilvēkiem, ne **HOPS**, ne **bronhiālās astmas** slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski neietekmēja makrofāgu absolūto skaitu ierosinātās krēpās, kā arī makrofāgu absolūtais skaits būtiski neatšķīrās starp pētītajām cilvēku grupām.

### 1.1.6. Limfocīti krēpās

Mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski neietekmēja limfocītu relatīvo un absolūto skaitu ierosinātās krēpās nevienā no pētītajām (**veselo cilvēku**, **HOPS** un **bronhiālās astmas slimnieku**) cilvēku grupām, kā arī limfocītu relatīvais un absolūtais skaits būtiski neatšķīrās starp šīm grupām.

### 1.1.7. Bazofīlie leukocīti krēpās

Arī bazofīlo leukocītu relatīvo un absolūto skaitu ierosinātās krēpās būtiski neietekmēja mūžā izsmēķētās tabakas daudzums nevienā no pētītajām cilvēku grupām. Arī bazofīlo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits būtiski neatšķīrās starp pētītajām **veselo cilvēku**, **HOPS** un **bronhiālās astmas slimnieku** grupām.

## 1.2. Smēķēšanas izraisītās pārmaiņas asins citoloģiskajos raksturlielumos

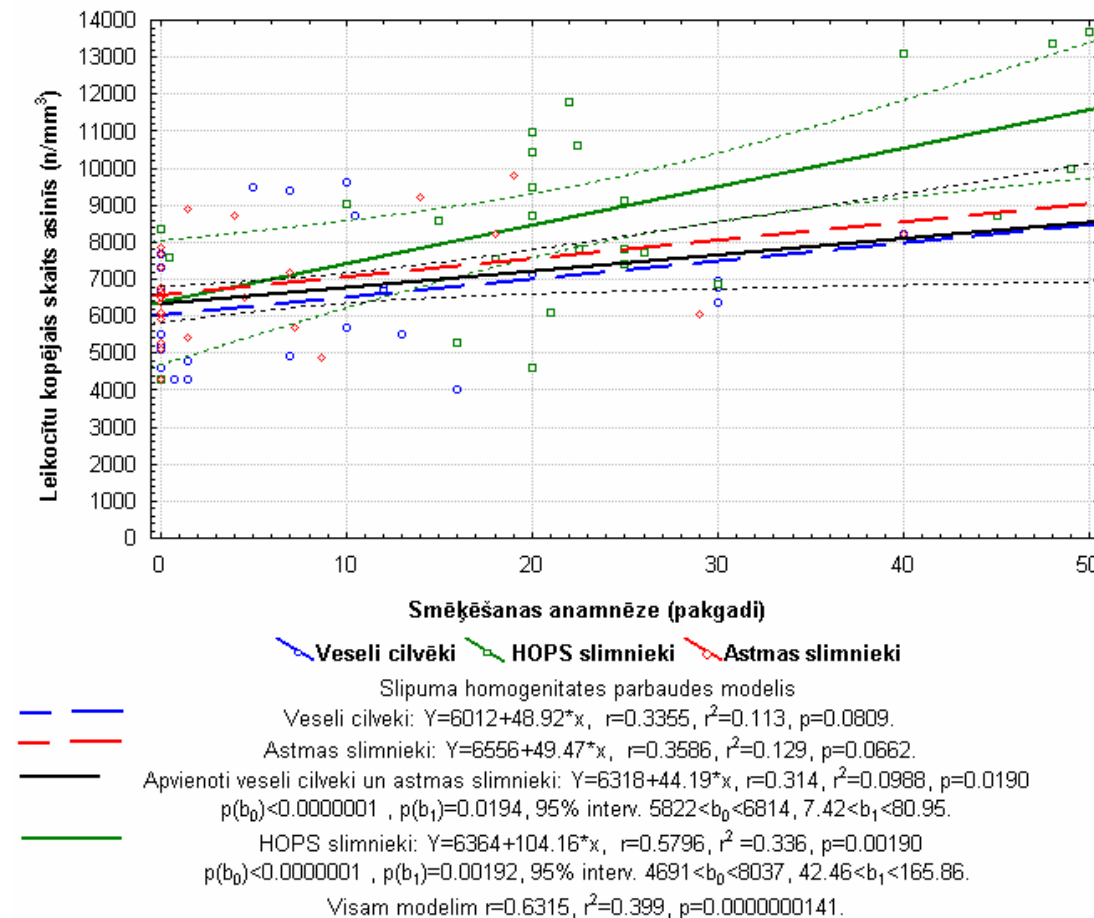
### 1.2.1. Kopējais leukocītu skaits asinīs

Gan **veseliem** cilvēkiem, gan **bronhiālās astmas** slimniekiem novēroja asins leukocītu kopējā skaita palielināšanās tendenci mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 15. att., zilā un sarkanā pārtrauktās līnija,  $p=0,0809$  un  $p=0,0662$ ).

Tā kā, izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēki un astmas slimnieku grupu regresijas vienādojumiem (gan  $b_0$

koeficienti neatšķirās,  $p=0,281$ , gan  $b_1$  koeficienti neatšķirās,  $p=0,989$ ), kā arī abas regresijas bija ar līdzīgu ticamību, matemātiski abas šīs grupas var apvienot vienā grupā (veselo cilvēku un astmas slimnieku grupā) un aprakstīt ar vienu regresijas vienādojumu ar lielāku ticamību ( $p=0,0190$ ; sk. 15. att., melnā nepārtrauktā līnija).

Arī **HOPS** slimniekiem konstatēja būtisku asins leikocītu kopējā skaita palielināšanos mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 15. att., zaļā nepārtrauktā līnija,  $p=0,00190$ ).



**15. attēls. Smēķēšanas ietekme uz leikocītu kopējo skaitu asinīs veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī kopā apvienotiem veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmētas veselu cilvēku un astmas slimnieku grupas pirms apvienošanas, ar nepārtrauktām līnijām - izveidotais divfaktoru lineārās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētu līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, neizdevās atrast būtiskas atšķirības asins leikocītu kopējā skaitā starp HOPS slimnieku un apvienoto veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu smēķētājiem ar mazu stāžu ( $b_0$  koeficientu atšķirība starp grupām nebūtiska,  $p=0,949$ ). Asins leikocītu kopējam skaitam HOPS slimnieku grupā

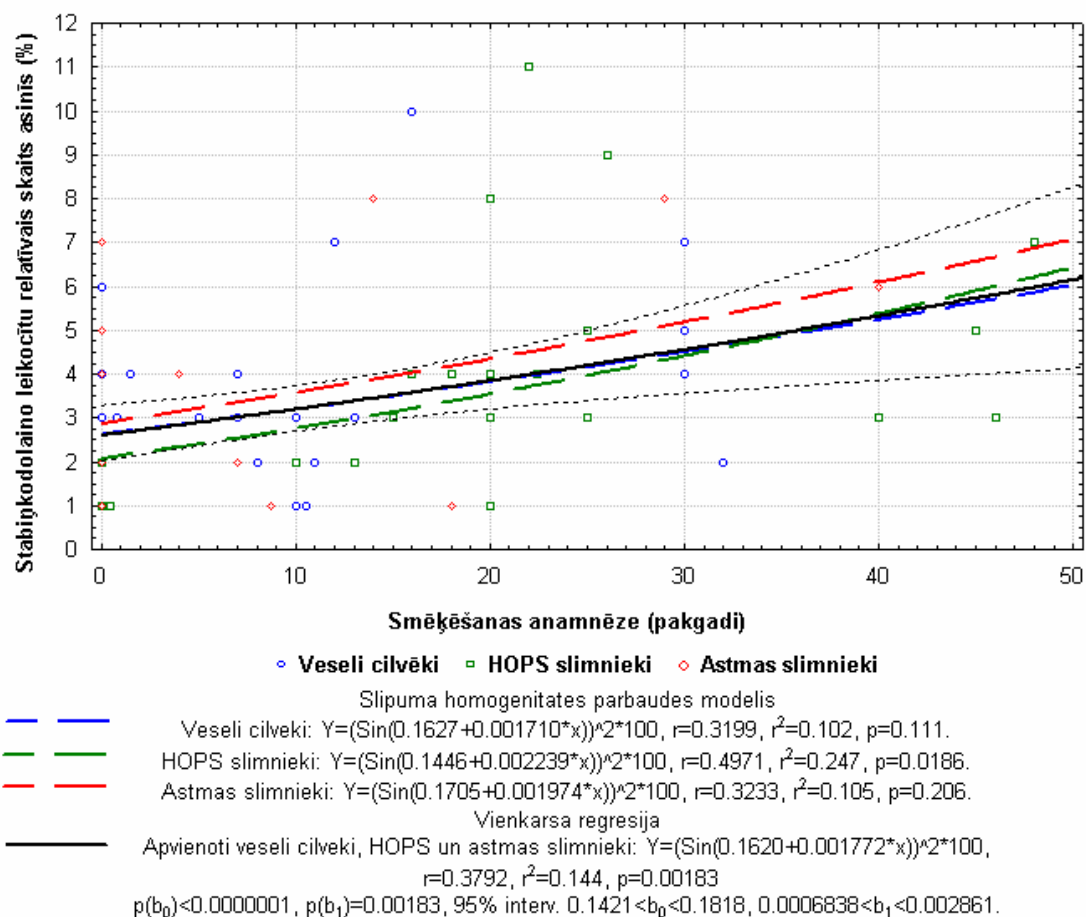
bija tendence pieaugt straujāk mūžā izsmēķētās tabakas ietekmē salīdzinājumā ar apvienoto veselocilvēku un astmas slimnieku grupu ( $b_1$  koeficientu atšķirība starp šīm grupām,  $p=0,0655$ ).

## 1.2.2. Neitrofilie leukocīti asinīs

### 1.2.2.1. Stabiņkodolainie neitrofilie leukocīti

#### 1.2.2.1.1. Relatīvais stabiņkodolaino neitrofilo leukocītu skaits asinīs

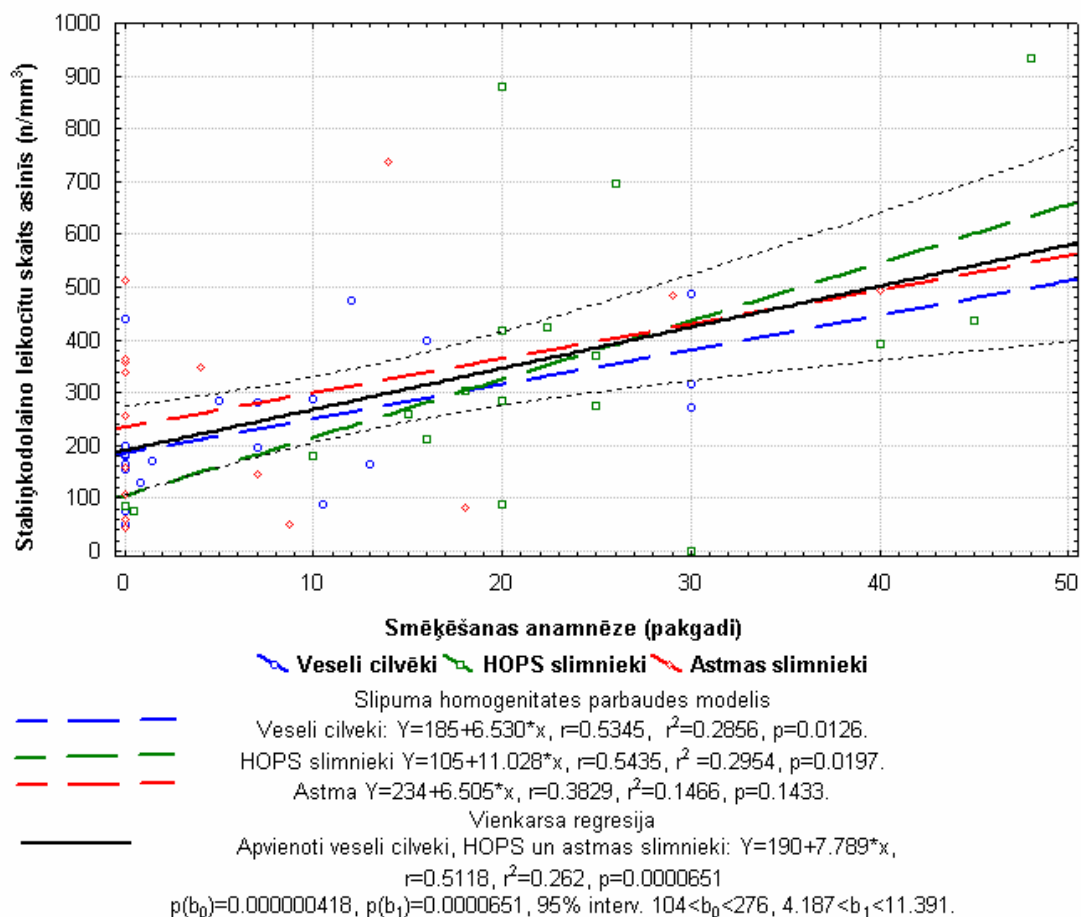
Visām trim pētītajām veselo cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupām novēroja stabiņkodolaino leukocītu relatīvā skaita palielināšanos venozajās asinīs mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 16. att., zilā, zaļā un sarkanā pārtrauktā līnija attiecīgi;  $p=0,111$ ,  $p=0,0186$  un  $p=0,206$ ).



**16. attēls. Smēķēšanas ietekme uz stabiņkodolaino leukocītu relatīvo skaitu venozajās asinīs veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī visām trīs grupām apvienotām vienā grupā.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmēts divfaktoru sinusa kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis, ar nepārtrauktu līniju - vienkārša vienfaktora sinusa regresija visām trim kopā apvienotām grupām. Ar punktētām līnijām apzīmēta regresijas 95% reprezentācijas zona.

Tā kā, izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, nekonstatēja būtiskas atšķirības starp modelī ietilpstošajiem veselo cilvēku, HOPS un astmas slimnieku grupu regresijas vienādojumiem (neatšķirās ne  $b_0$ ,  $p=0,660$ , ne  $b_1$ ,  $p=0,935$  koeficienti) arī kopējā smēķēšanas ietekme bija būtiska ( $p=0,00327$ ) un regresijas bija ar līdzīgu ticamību, visas šīs grupas matemātiski var apvienot vienā grupā (apvienotā veselo cilvēku, HOPS un astmas slimnieku grupā) un aprakstīt ar vienu vienfaktora sinusa regresijas vienādojumu ar lielāku drošību  $p=0,00183$  (sk. 16. att., melnā nepārtrauktā līnija). Tāpēc var apgalvot, ka neatkarīgi no mūsu pētījumā iekļautām diagnozēm stabiņkodolaino leukocītu relatīvais skaits palielinās mūžā izsēķētās tabakas daudzuma ietekmē.

### 1.2.2.1.2. Absolūtais stabiņkodolaino neitrofilo leukocītu skaits asinīs



**17. attēls. Smēķēšanas ietekme uz stabiņkodolaino leukocītu absolūto skaitu venozajās asinīs veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī visām trīs grupām apvienotām vienā grupā.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmēts divfaktoru lineārās kovariācijas analīzes slipuma homogenitātes pārbaudes modelis, ar nepārtrauktu līniju - vienkārša vienfaktora lineārā regresija visām trim kopā apvienotām grupām. Ar punktētām līnijām apzīmēta regresijas 95% reprezentācijas zona.



Gan **veseliem** cilvēkiem, gan **HOPS**, gan **bronhiālās astmas** slimniekiem novēroja asins stabiņkodolaino leukocītu absolūtā skaita palielināšanos mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 17. att., zilā, zaļā un sarkanā pārtrauktā līnija attiecīgi;  $p=0,0126$ ,  $p=0,0197$  un  $p=0,143$ ).

Tā kā, izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp modelī ietilpstošajiem veselo cilvēku, HOPS un astmas slimnieku grupu regresijas vienādojumiem (neatšķirās ne  $b_0$ ,  $p=0,445$ , ne  $b_1$ ,  $p=0,588$  koeficienti), arī kopējā smēķēšanas ietekme modelī bija būtiska ( $p=0,000472$ ) un regresijas bija ar līdzīgu ticamību, visas šīs grupas matemātiski var apvienot vienā grupā (apvienotā veselo cilvēku, HOPS un astmas slimnieku grupā) un aprakstīt ar vienu vienfaktora lineāro regresijas vienādojumu ar lielāku drošību  $p=0,0000651$  (sk. 17. att., melnā nepārtrauktā līnija).

Tāpēc var apgalvot, ka neatkarīgi no mūsu pētījumā iekļautām diagnozēm stabiņkodolaino leukocītu absolūtais skaits palielinās mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē.

### **1.2.2.2. Segmentkodolainie neitrofilie leukocīti**

#### **1.2.2.2.1. Relatīvais segmentkodolaino neitrofilo leukocītu skaits asinīs**

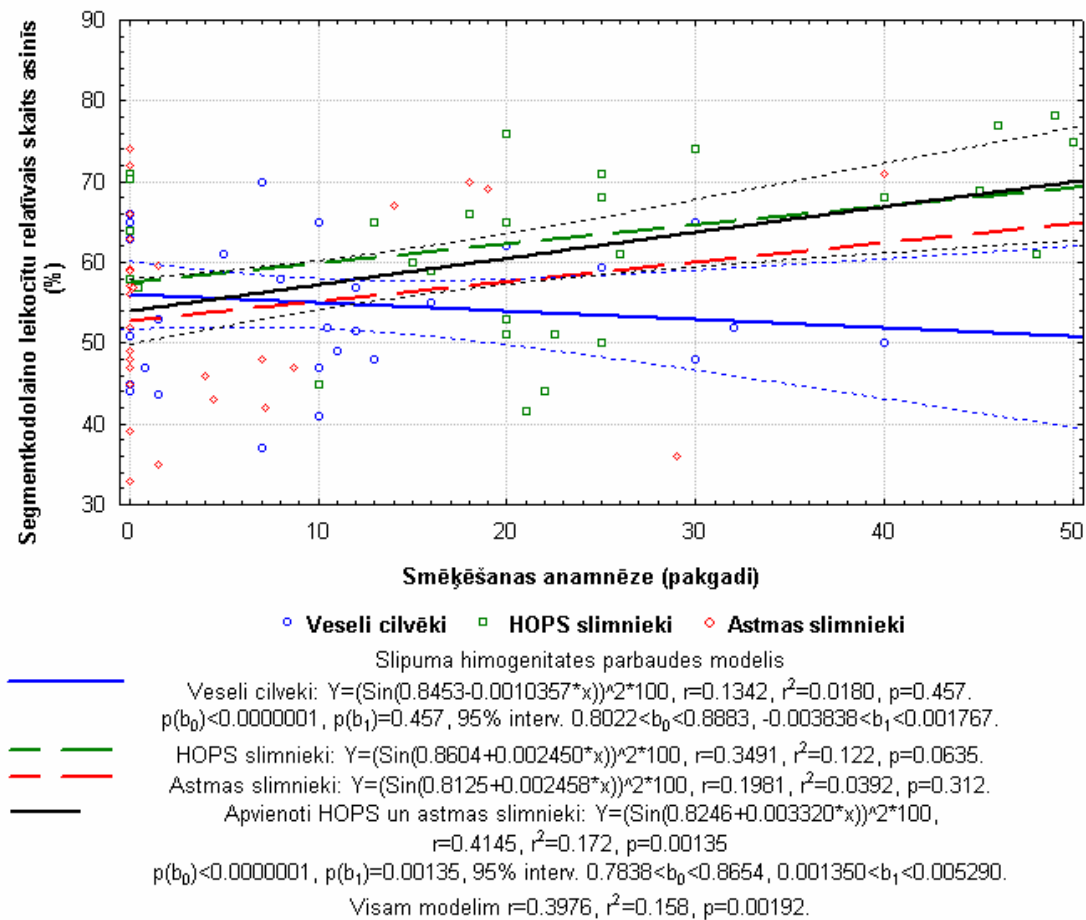
Gan **HOPS**, gan **bronhiālās astmas** slimniekiem konstatēja asins segmentkodolaino neitrofilo leukocītu relatīvā skaita palielināšanos mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 18. att., zaļā un sarkanā pārtrauktā līnija attiecīgi,  $p=0,0635$  un  $p=0,312$ ).

Tā kā, izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp HOPS un astmas slimnieku grupu regresijas vienādojumiem (gan  $b_0$  koeficienti neatšķirās,  $p=0,292$ , gan  $b_1$  koeficienti neatšķirās,  $p=0,997$ ), arī kopējai smēķēšanas ietekmei HOPS un astmas slimnieku modelī bija tendence pieaugt ( $p=0,0640$ ) un abas regresijas bija ar līdzīgu ticamību, matemātiski abas šīs grupas var apvienot vienā grupā (HOPS un astmas slimnieku grupā) un aprakstīt ar vienu regresijas vienādojumu ar lielāku ticamību ( $p=0,00135$ ; sk. 18. att., melnā nepārtrauktā līnija).

**Veselo** cilvēku grupā netika konstatēta ticama mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz segmentkodolaino neitrofilo leukocītu relatīvo skaitu venozajās asinīs (sk. 18. att., zilie,  $p=0,457$ ).

Izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, neizdevās atrast būtiskas atšķirības asins segmentkodolaino leukocītu relatīvā šūnu skaitā starp veselo cilvēku un

apvienoto HOPS un astmas slimnieku grupu smēķētājiem ar mazu stāžu ( $b_0$  koeficientu atšķirība starp grupām nebūtiska,  $p=0,509$ ). Turpretī mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz segmentkodolaino leukocītu relatīvo skaitu venozajās asinīs būtiski atšķirās starp veselo cilvēku grupu un apvienoto HOPS un astmas slimnieku grupu,  $p=0,0211$ . Ja HOPS un astmas slimnieku grupai būtiski palielinājās segmentkodolaino leukocītu relatīvais skaits asinīs, veselo cilvēku grupai tas būtiski nemainījās (pat nedaudz mazinājās) izsmēķēto pakgdu ietekmē (sk. 18. att., melnā un zilā nepārtrauktā līnija).



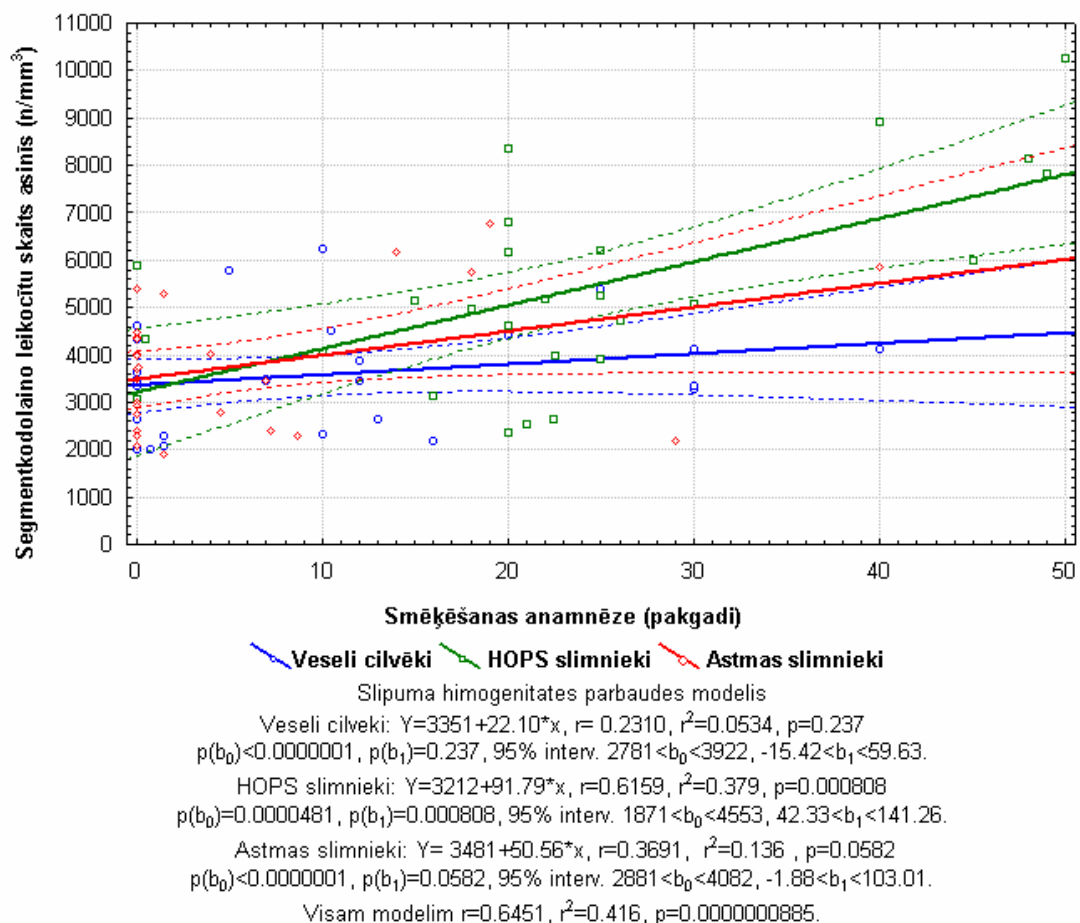
**18. attēls. Smēķēšanas ietekme uz segmentkodolaino neitrofilo leukocītu relatīvo skaitu venozajās asinīs veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī kopā apvienotiem HOPS un astmas slimniekiem.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmētas HOPS un astmas slimnieku grupas pirms apvienošanas, ar nepārtrauktām līnijām - izveidotais divfaktoru sinusa kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šī modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

### 1.2.2.2.2. Absolūtais segmentkodolaino neitrofilu leukocītu skaits asinīs

**Veseliem** cilvēkiem mūžā izsmēķētais tabakas daudzums būtiski neietekmēja segmentkodolaino neitrofilo leukocītu absolūto skaitu venozajās asinīs (sk. 19. att., zilie,  $p=0,237$ ).

**HOPS** slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē novēroja būtisku asins segmentkodolaino neitrofilo leukocītu absolūtā skaita palielināšanos (sk. 19. att., zaļie,  $p=0,000808$ ).

**Bronhiālās astmas** slimniekiem konstatēja asins segmentkodolaino neitrofilo leukocītu absolūtā skaita palielināšanās tendenci, bet mazāk izteiktu nekā HOPS slimniekiem (sk. 19. att., sarkanie,  $p=0,0582$ ).

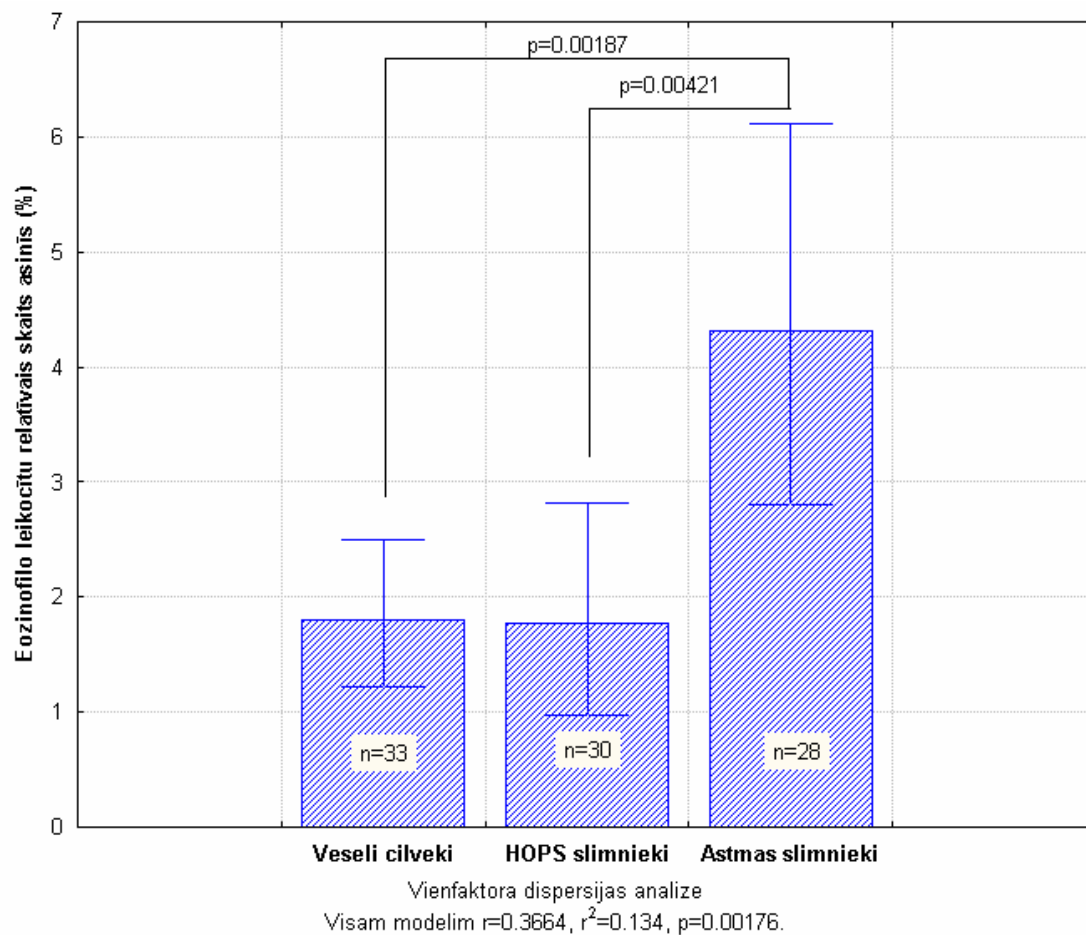


**19. attēls.** Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz segmentkodolaino neitrofilo leukocītu absolūto skaitu venozajās asinīs veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem. Divfaktoru lineārās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, neizdevās atrast būtiskas asins segmentkodolaino neitrofilo leukocītu skaita atšķirības starp visu grupu smēķētājiem ar mazu stāžu (sk. 19. att.,  $b_0$  koeficientu atšķirības starp grupām nebūtiskas- līkņu augstums pie 0 pakgadiem būtiski neatšķiras). Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmes uz asins segmentkodolaino leukocītu skaitu ( $b_1$  koeficienti) starp veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu, kā arī starp HOPS un astmas slimnieku grupu būtiski neatšķīrās (attiecīgi  $p=0,361$  un  $p=0,259$ ), turpretī būtiska atšķirība tika atklāta starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu ( $p=0,0276$ ).

### 1.2.3. Eozinofīlie leukocīti asinīs

#### 1.1.3.1. Relatīvais eozinofilo leukocītu skaits asinīs



**20. attēls. Eozinofilo leukocītu relatīvais skaits venozajās asinīs veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Vienfaktora nelineārās dispersijas analīzes modelis. Lai normalizētu sadalījumu, pirms analīzes veikta arksinusa transformācija, pēc aprēķiniem veikta atgriezeniska sinusa transformācija. Ar stabiņiem apzīmēti vidējie aritmētiskie, ar svītriņām - vidējo aritmētisko 95% reprezentācijas intervāli. Atšķirības starp atsevišķām grupām pārbaudītas izmantojot Nūmana - Keula testu.

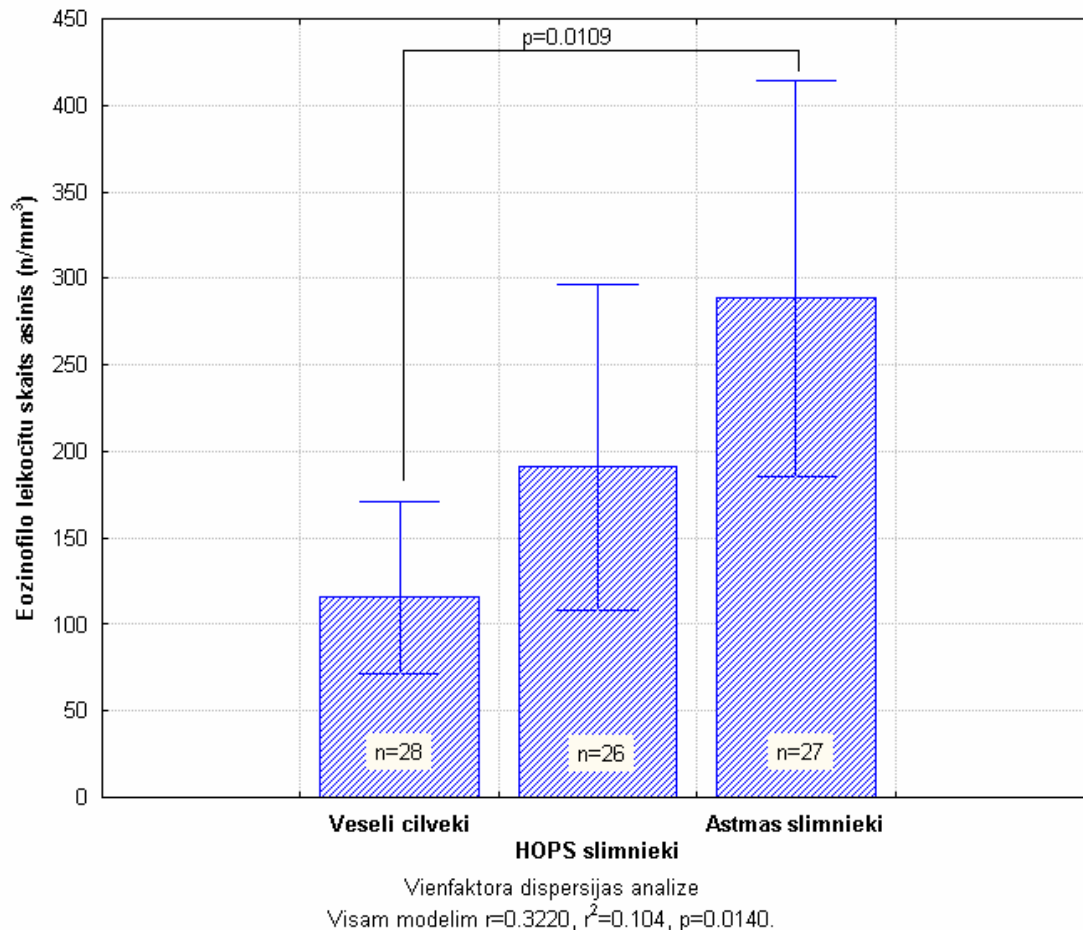
Tā kā, izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz asins eozinofilo leukocītu relatīvo skaitu ( $b_1$  koeficienti) nebija būtiska nevienai pētītajai cilvēku grupai, kā arī būtiski neatšķīrās starp šīm grupām, bet tika novērota būtiska atšķirība eozinofilo leukocītu relatīvā skaitā starp grupām ( $b_0$  koeficienti atšķīrās būtiski,  $p=0,00606$  – diagnozes ietekme būtiska), divfaktoru SKASHP modelis tika aizstāts (izmetot smēķēšanas faktoru un smēķēšanas un diagnozes mijiedarbības faktoru) ar vienfaktora nelineāro dispersijas analīzes modeli (NDA).

Izmantojot vienfaktora NDA modeli netika novērotas būtiskas atšķirības asins eozinofilo leukocītu relatīvajā skaitā starp **veselu** cilvēku un **HOPS** slimnieku grupām (sk. 20. att., attiecīgi 1,807% (no 1,225 līdz 2,499%) un 1,774% (no 0,970 līdz 2,813%)). Turpretī **bronhiālās astmas** slimniekiem atklāja būtiski palielinātu eozinofilo leukocītu relatīvo skaitu venozajās asinīs (4,307% (no 2,801 līdz 6,119%)) salīdzinājumā ar veselīgiem cilvēkiem ( $p=0,00187$ ) un HOPS slimniekiem ( $p=0,00421$ ) (sk. 20. att.).

### 1.1.3.2. Absolūtais eozinofilo leukocītu skaits asinīs

Tā kā, izmantojot divfaktoru PKASHP modeli, mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz asins eozinofilo leukocītu absolūto skaitu ( $b_1$  koeficienti) nebija būtiska nevienai pētītajai cilvēku grupai, kā arī būtiski neatšķīrās starp šīm grupām, bet tika novērota būtiska atšķirība eozinofilo leukocītu skaitā starp grupām ( $b_0$  koeficienti atšķīrās būtiski,  $p=0,00862$  – diagnozes ietekme būtiska), divfaktoru PKASHP modelis tika aizstāts (izmetot smēķēšanas faktoru un smēķēšanas un diagnozes mijiedarbības faktoru) ar vienfaktora NDA modeli.

Izmantojot šo modeli netika novērotas būtiskas atšķirības asins eozinofilo leukocītu absolūtajā skaitā starp **veselu** cilvēku un **HOPS** slimnieku grupām (sk. 15. att. attiecīgi  $116 \text{ n/mm}^3$  (no 71 līdz  $171 \text{ n/mm}^3$ ) un  $191 \text{ n/mm}^3$  (no 108 līdz  $297 \text{ n/mm}^3$ )), kā arī **HOPS** un **bronhiālās astmas** grupām (sk. 21. att.). Turpretī **bronhiālās astmas** slimniekiem novēroja būtiski palielinātu eozinofilo leukocītu skaitu venozajās asinīs ( $289 \text{ n/mm}^3$  (no 185 līdz  $414 \text{ n/mm}^3$ )) salīdzinājumā ar veselīgiem cilvēkiem ( $p=0,0109$ ) (sk. 21. att.).



**21. attēls. Eozinofilo leukocītu absolūtais skaits venozajās asinīs veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Vienfaktora nelineārās dispersijas analīzes modelis. Lai normalizētu sadalījumu, pirms analīzes veikta kvadrātsaknes transformācija, pēc aprēķiniem veikta atgriezeniska kvadrātiska transformācija. Ar stabīniem apzīmēti vidējie aritmētiskie, ar svītriņām - vidējo aritmētisko 95% reprezentācijas intervāli. Atšķirības starp atsevišķām grupām pārbaudītas, izmantojot Ņūmana - Keula testu.

#### 1.1.4. Monocīti asinīs

##### 1.1.4.1. Relatīvais monocītu skaits asinīs

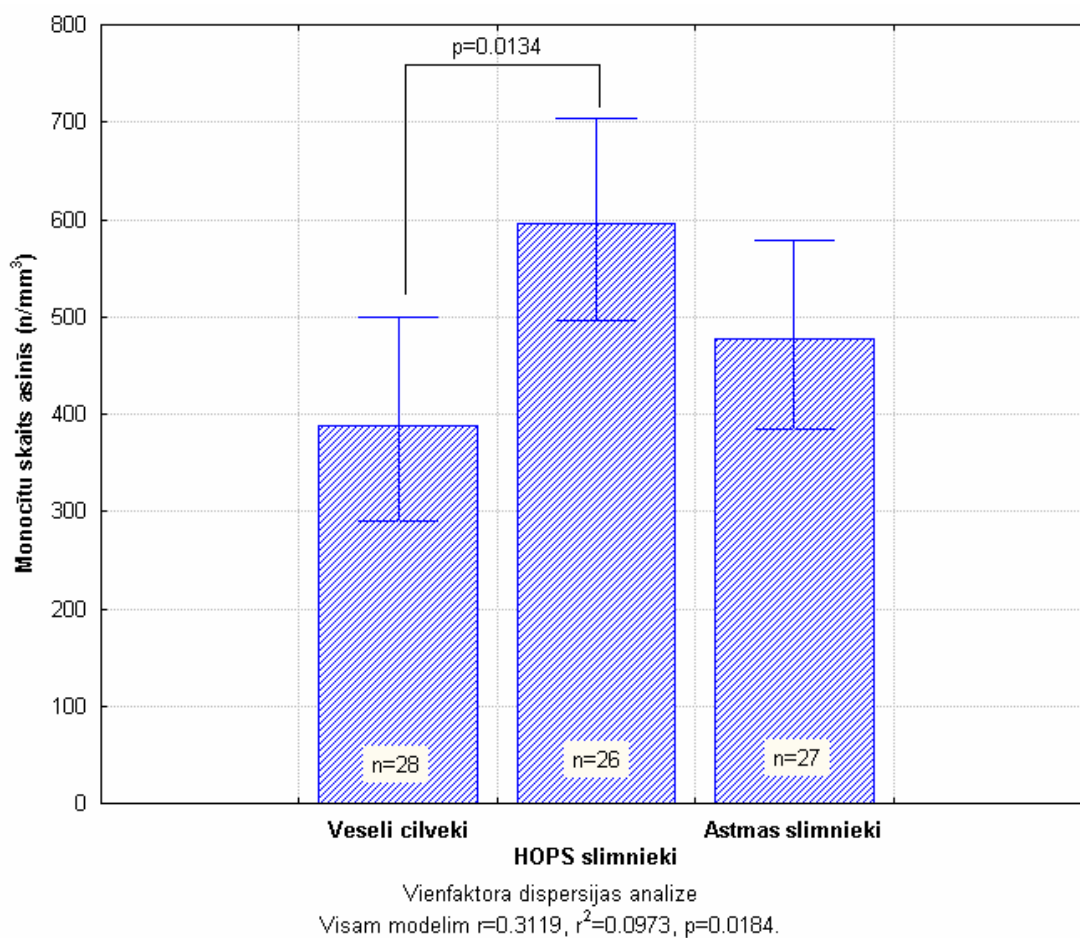
Mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski neietekmēja monocītu relatīvo skaitu venozajās asinīs nevienā pētītajā (**veselo cilvēku, HOPS, un bronhiālās astmas slimnieku**) grupā, arī monocītu relatīvais skaits būtiski neatšķīrās starp šīm grupām.

##### 1.1.4.2. Absolūtais monocītu skaits asinīs

Tā kā, izmantojot divfaktoru PKASHP modeli mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz asins monocītu absolūto skaitu ( $b_1$  koeficienti) būtiski neatšķīrās starp grupām, divfaktoru PKASHP modelis tika aizstāts ar divfaktoru PKKA modeli. Izmantojot divfaktoru PKKA modeli, netika atklāta būtiska mūžā

izsmēķēto pakgadu skaita ietekme uz monocītu absolūto skaitu asinīs, bet tika konstatēta monocītu skaita atšķirības tendence starp pētītajām cilvēku grupām ( $b_0$  koeficienti atšķirās,  $p=0,0847$  – tendence atšķirties diagnožu ietekmei), tad divfaktoru PKKA modelis tika aizstāts (izmetot smēķēšanas faktoru) ar vienfaktora NDA modeli.

Izmantojot šo modeli tika novērots būtiski palielināts asins monocītu absolūtais skaits **HOPS** slimniekiem salīdzinājumā ar **veseliem** cilvēkiem (sk. 22. att.,  $p=0,0134$ ; attiecīgi  $596 \text{ n/mm}^3$  (no  $497$  līdz  $703 \text{ n/mm}^3$ ) un  $388 \text{ n/mm}^3$  (no  $290$  līdz  $499 \text{ n/mm}^3$ )). Turpretī būtiskas atšķirības netika novērotas starp **veselu** cilvēku un **bronhiālās astmas** slimnieku grupām, kā arī starp **HOPS** un **bronhiālās astmas** slimnieku grupām (sk. 22. att. astmas grupai:  $477 \text{ n/mm}^3$  (no  $384$  līdz  $579 \text{ n/mm}^3$ )).

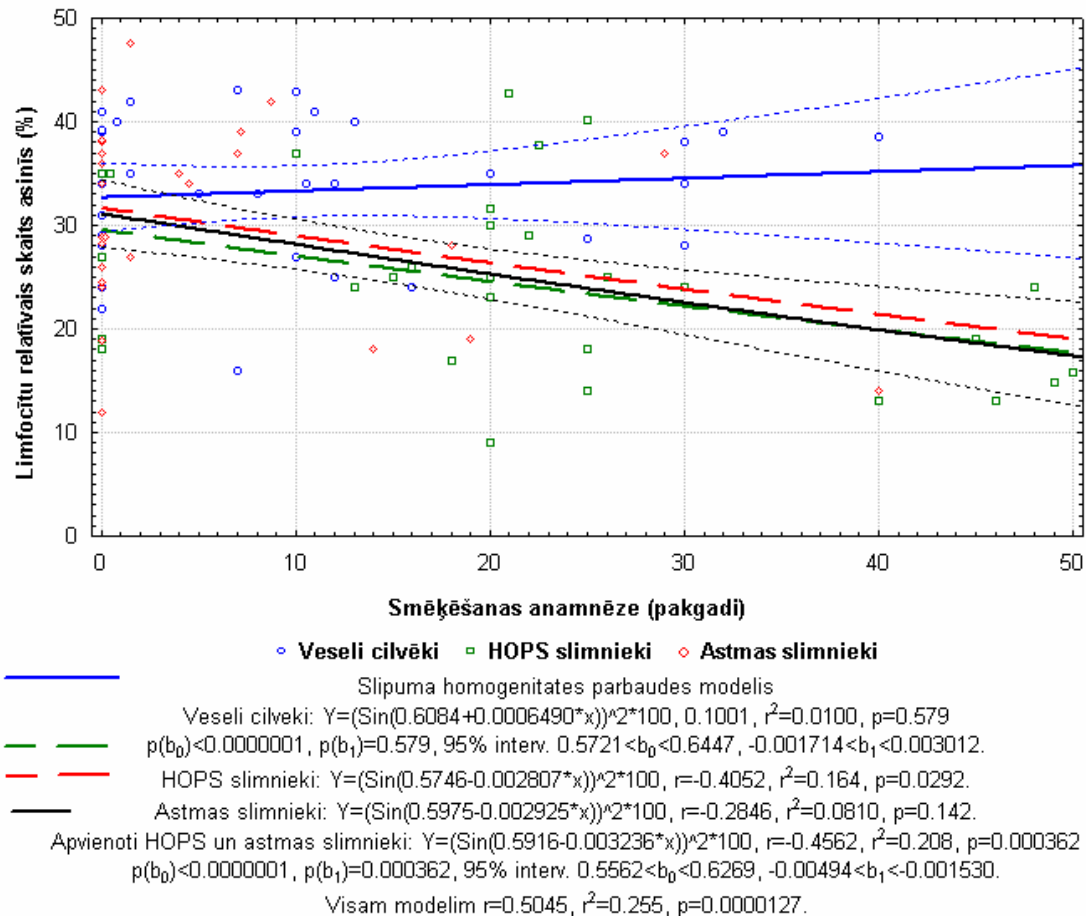


**22. attēls. Monocītu absolūtais skaits venozajās asinīs veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Vienfaktora nelineārās dispersijas analīzes modelis. Lai normalizētu sadalījumu, pirms analīzes veikta kvadrātsaknes transformācija, pēc aprēķiniem veikta atgriezeniska kvadrātiska transformācija. Ar stabiņiem apzīmēti vidējie aritmētiskie, ar svītriņām - vidējo aritmētisko 95% reprezentācijas intervāli. Atšķirības starp atsevišķām grupām pārbaudītas, izmantojot Nūmana - Keula testu.

## 1.1.5. Limfocīti asinīs

### 1.1.5.1. Relatīvais limfocītu skaits asinīs

Veseliem cilvēkiem netika novērota būtiska mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz limfocītu relatīvo skaitu venozajās asinīs (sk. 23. att., zilie,  $p=0,579$ ).



**23. attēls. Smēķēšanas ietekme uz limfocītu relatīvo skaitu venozajās asinīs veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī kopā apvienotiem HOPS un astmas slimniekiem.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmētas HOPS un astmas slimnieku grupas pirms apvienošanas, ar nepārtrauktām līnijām - izveidotais divfaktoru sinusa kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētu līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Gan HOPS, gan bronhiālās astmas slimniekiem konstatēja limfocītu relatīvā skaita mazināšanos venozajās asinīs mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 23. att., zaļa  $p=0,0296$  un sarkanā,  $p=0,142$ , pārtrauktā līnija). Tā kā, izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, neatklāja būtiskas atšķirības starp HOPS un astmas slimnieku grupu regresijas vienādojumiem (gan  $b_0$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,563$ , gan  $b_1$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,959$ ), arī abas regresijas bija ar līdzīgu ticamību,



matemātiski abas šīs grupas var apvienot vienā grupā (apvienotā HOPS un astmas slimnieku grupā) un aprakstīt ar vienu regresijas vienādojumu ar lielāku ticamību ( $p=0,000362$ ; sk. 23. att., melnā nepārtrauktā līnija).

Izmantojot divfaktoru SKASHP modeli, neizdevās atrast būtiskas atšķirības asins limfocītu relatīvā skaitā starp veselo un apvienoto HOPS un astmas slimnieku grupu smēķētājiem ar mazu stāžu ( $b_0$  koeficientu atšķirība starp grupām nebūtiska,  $p=0,533$ ). Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz limfocītu relatīvo skaitu asinīs ( $b_1$  koeficienti) starp veselo cilvēku grupu un apvienoto HOPS un astmas slimnieku grupu atšķīrās būtiski,  $p=0,0169$ : ja veselu cilvēku grupai limfocītu relatīvais skaits būtiski nemainījās, tad HOPS un astmas slimnieku grupai tas būtiski mazinājās (sk. 23. att., zilā un melnā nepārtrauktā līnija).

### 1.1.5.2. Absolūtais limfocītu skaits asinīs

Ne **veseliem** cilvēkiem, ne **HOPS**, ne **bronhiālās astmas** slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski neietekmēja asins limfocītu absolūto skaitu, kā arī limfocītu absolūtais skaits būtiski neatšķīrās starp pētītajām cilvēku grupām.

### 1.1.6. Bazofīlie leukocīti asinīs

Mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski neietekmēja bazofīlo leukocītu relatīvo un absolūto skaitu venozajās asinīs nevienā no pētītajām (**veselo cilvēku**, **HOPS**, un **bronhiālās astmas slimnieku**) grupām, kā arī bazofīlo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits būtiski neatšķīrās starp šīm grupām.

## 2. Bioķīmiskie raksturlielumi

### 2.1. Smēķēšanas izraisītās krēpu antioksidatīvā statusā pārmaiņas

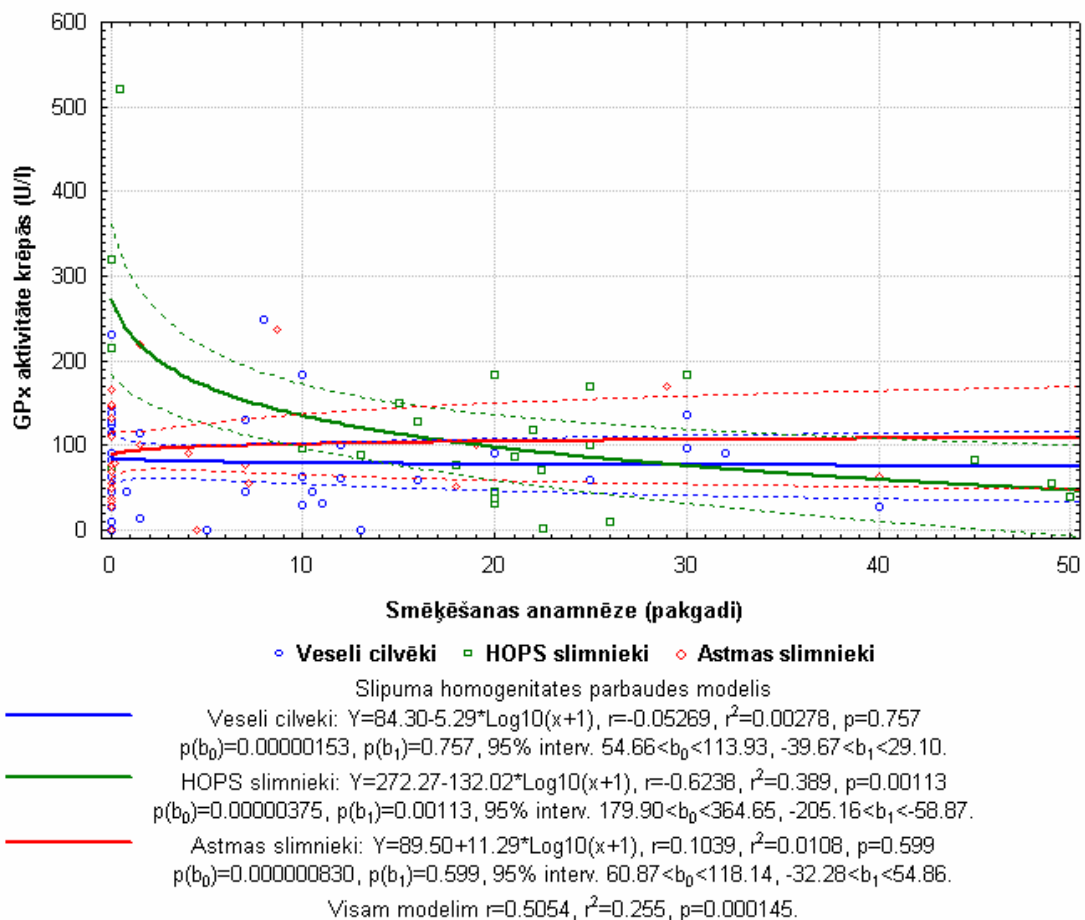
#### 2.1.1. Glutaciona peroksidāzes aktivitāte krēpās

Ne **veseliem** cilvēkiem, ne **bronhiālās astmas** slimniekiem netika atklāta būtiska mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti ierosinātās krēpās (sk. 24. att., zilie,  $p=0,757$  un sarkanie,  $p=0,599$ ).

Turpretī **HOPS** slimnieku grupā novēroja būtisku glutaciona peroksidāzes aktivitātes mazināšanos mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekmē (sk. 24. att., zaļie,  $p=0,00113$ ).

Izmantojot divfaktoru LGKASHP modeli, tika konstatēts, ka glutaciona peroksidāzes aktivitāte HOPS slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu ir būtiski palielināta salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem ar mazu smēķēšanas stāžu ( $p=0,0000200$ ) kā arī salīdzinājumā ar bronhiālās astmas slimniekiem ar mazu

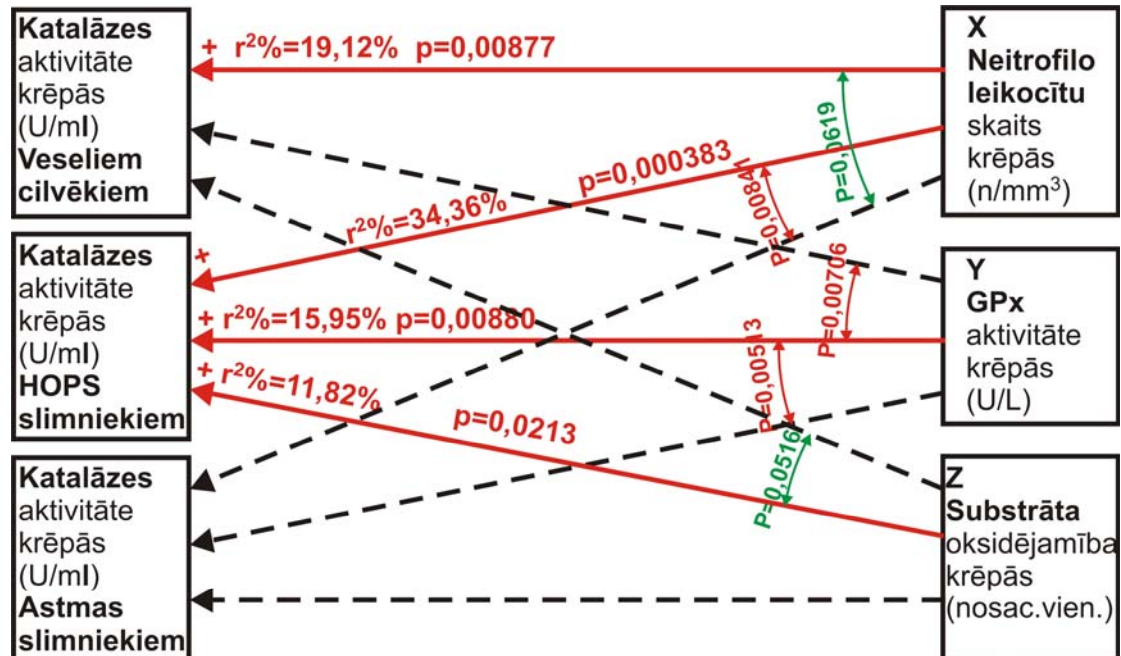
smēķēšanas stāžu, par ko liecina  $b_0$  koeficientu atšķirības starp šīm grupām ( $p=0,0000520$ ), turpretī starp veseliem cilvēkiem ar mazu smēķēšanas stāžu un astmas slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu netika atklāta būtiska atšķirība ( $p=0,798$ ) (sk. 24. att., līknes pie 0 pakgadiem). Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē HOPS slimniekiem būtiski straujāk mazinās glutaciona peroksidāzes aktivitāte salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem ( $p=0,000693$ ) un salīdzinājumā ar bronhiālās astmas slimniekiem ( $p=0,000731$ ), uz ko norāda būtiskā atšķirība starp smēķēšanas ietekmi (starp  $b_1$  koeficientiem) starp šīm grupām (sk. 24. att., attiecīgi zaļā, zilā un sarkanā līkne). Turpretī mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti ( $b_1$  koeficienti) starp veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu būtiski neatšķīrās,  $p=0,545$  (sk. 24. att., zilās un sarkanās līknes slīpumi).



**24. attēls. Smēķēšanas ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Divfaktoru logaritmiskās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

## 2.1.2. Katalāzes aktivitāte krēpās

Ne **veseliem** cilvēkiem, ne **HOPS**, ne **bronhiālās astmas** slimniekiem netika novērota būtiska mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz ierosināto krēpu supernatanta katalāzes aktivitāti.



**Veseli cilvēki**  $k=3,106 * x^{0,2713} * (y+1)^{-0,09286} * z^{-0,003653} - 1$ ,  $r=0,4639$ ,  $r^2=0,215$ ,  $p=0,0491$   
 $p(b_0)=0,492$ ,  $p(b_1)=0,00877$ ,  $p(b_2)=0,332$ ,  $p(b_3)=0,969$ .

95% intervāls:

$0,6356 < b_0 < 15,18$ ,  $0,07336 < b_1 < 0,4692$ ,  $-0,2851 < b_2 < 0,09934$ ,  $-0,1938 < b_3 < 0,1865$ .

**HOPS slimnieki**  $k=0,02145 * x^{0,4838} * (y+1)^{0,3844} * z^{0,3438} - 1$ ,  $r=0,7883$ ,  $r^2=0,621$ ,  
 $p=0,0000402$ .

$p(b_0)=0,00183$ ,  $p(b_1)=0,000383$ ,  $p(b_2)=0,00880$ ,  $p(b_3)=0,0213$ .

95% intervāls:

$0,002303 < b_0 < 0,1998$ ,  $0,2469 < b_1 < 0,7207$ ,  $0,1082 < b_2 < 0,6606$ ,  $0,05685 < b_3 < 0,6307$ .

**Astmas slimnieki**  $k=63,46 * x^{-0,09851} * (y+1)^{-0,2911} * z^{0,1144} - 1$ ,  $r=0,3647$ ,  $r^2=0,133$ ,  $p=0,391$   
 $p(b_0)=0,0443$ ,  $p(b_1)=0,594$ ,  $p(b_2)=0,133$ ,  $p(b_3)=0,579$ .

95% intervāls:

$1,124 < b_0 < 3583$ ,  $-0,4782 < b_1 < 0,2812$ ,  $-0,6786 < b_2 < 0,09633$ ,  $-0,3084 < b_3 < 0,5371$ .

**Visam modelim**  $r=0,6242$ ,  $r^2=0,390$ ,  $p=0,0000897$ .

**25. attēls.** Krēpu neitrofilo leukocītu relatīvā skaita, krēpu supernatanta glutaciona peroksidāzes aktivitātes un krēpu supernatanta substrāta oksidējamības ietekme uz katalāzes aktivitāti ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem. Četrfaktoru pakāpes kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Modelis attēlots shematiski, jo nav iespējams attēlot četrdimensiju telpu grafiski. Ar leņķa apzīmējumiem attēlota diagnozes un attiecīgā kvantitatīvā faktora mijiedarbība-attiecīgā faktora ietekmes atšķirības starp pētītajām slimieku grupām.

Vislabāk krēpu supernatanta katalāzes aktivitāti **HOPS** slimniekiem var skaidrot, izmantojot trīsfaktoru pakāpes regresijas modeli, kas ietilpst četrfaktoru

PAKASHP modelī. Šai trīsfaktoru pakāpes regresijas modelī atkarīgais faktora k- katalāzes aktivitāte mainās atkarībā no neatkarīgajiem kvantitatīvajiem faktoriem: x- neitrofilo leukocītu absolūtā skaita krēpās, y- glutaciona peroksidāzes aktivitātes krēpu supernatantā un z- krēpu supernatanta oksidējamības. Savukārt, lai pārbaudītu atšķirības faktoru ietekmē starp veselu cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupām, visu šo grupu regresijas apvienotas četrfaktoru pakāpes kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes (PAKASHP) modelī, kur ceturtais neatkarīgais kvalitatīvais faktors ir diagnoze ar trim klasēm (veseli cilvēki, HOPS, astmas slimnieki). Tā kā četrdimensiju telpas grafiku nav iespējams attēlot, šis modelis attēlots shēmas veidā (sk. 25. att.).

**HOPS** slimnieku grupā katalāzes aktivitāti krēpās būtiski pozitīvi ietekmēja neitrofilo leukocītu relatīvais skaits krēpās- faktora ietekmes īpatsvars 34,4%,  $p=0,000389$ , glutaciona peroksidāzes aktivitāte krēpās- faktora ietekmes īpatsvars 16,0%,  $p=0,00880$  un krēpu supernatanta substrāta oksidējamība- faktora ietekmes īpatsvars 11,8%,  $p=0,0213$ . Kopējais trīsfaktoru pakāpes regresijas modeļa faktoru ietekmes īpatsvars HOPS slimniekiem bija 62,1%,  $p=0,0000402$  (sk. 25. att.).

**Veselu** cilvēku grupā katalāzes aktivitāti krēpās būtiski pozitīvi ietekmēja neitrofilo leukocītu relatīvais skaits krēpās- faktora ietekmes īpatsvars 19,1%,  $p=0,00877$ , turpretī glutaciona peroksidāzes aktivitātei un substrāta oksidējamībai krēpu supernatantā nebija būtiskas ietekmes uz katalāzes aktivitāti krēpās šai grupai (sk. 25. att., attiecīgi  $p=0,332$  un  $p=0,969$ ). Kopējais trīsfaktoru pakāpes regresijas modeļa faktoru ietekmes īpatsvars veseliem cilvēkiem bija 21,5%,  $p=0,0491$  (sk. 25. att.).

**Bronhiālās astmas** slimniekiem netika novērota ticama krēpu neitrofilo leukocītu, glutaciona peroksidāzes un krēpu supernatanta substrāta oksidējamības ietekme uz katalāzes aktivitāti krēpās (sk. 25. att., attiecīgi  $p=0,594$ ,  $p=0,133$ ,  $p=0,579$ ).

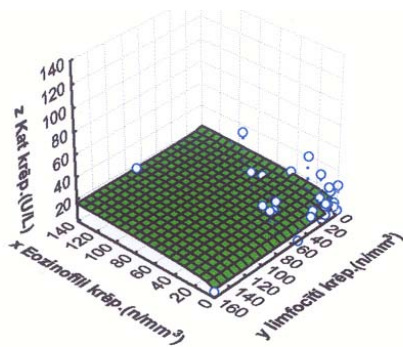
Izmantojot četrfaktoru PAKASHP modeli, tika konstatēts, ka diagnozes ietekme uz katalāzes aktivitāti ir būtiska- HOPS slimnieku grupai  $b_0$  koeficients ir būtiski mazāks nekā veselo cilvēku un bronhiālās astmas slimnieku grupām ( $p=0,000715$  un  $p=0,000544$  attiecīgi).  $b_0$  koeficients raksturo, kāda būtu katalāzes aktivitāte katrā slimnieku grupā, ja būtu izslēgta pārējo faktoru (neitrofilo leukocītu skaits krēpās, glutaciona peroksidāzes aktivitāte krēpās un krēpu supernatanta oksidējamība) ietekme (shēmā nav attēlota).

Neitrofilo leukocītu absolūtā skaita krēpās ietekme uz katalāzes aktivitāti ( $b_1$  koeficienti) starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu būtiski neatšķīrās,  $p=0,175$  (sk. 25. att., attiecīgais leņķa apzīmējums), jo abām grupām šī ietekme bija pozitīva un būtiska. Turpretī, salīdzinot neitrofilo leukocītu absolūtā skaita krēpās ietekmi uz katalāzes aktivitāti ( $b_1$  koeficienti) starp HOPS un astmas slimnieku grupu, HOPS grupai atklāja būtiski ( $p=0,00841$ ) lielāku pozitīvu neitrofilo leukocītu skaita ietekmi uz katalāzes aktivitāti salīdzinājumā ar astmas slimnieku grupu (sk. 25. att., attiecīgais leņķa apzīmējums), kam šāda ietekme netika novērota. Arī salīdzinot neitrofilo leukocītu ietekmi uz katalāzes aktivitāti veselo cilvēku un astmas slimnieku grupās, veselo cilvēku grupai novēroja lielāku neitrofilo leukocītu absolūtā skaita ietekmes tendenci salīdzinājumā ar astmas slimnieku grupu ( $p=0,0619$ ).

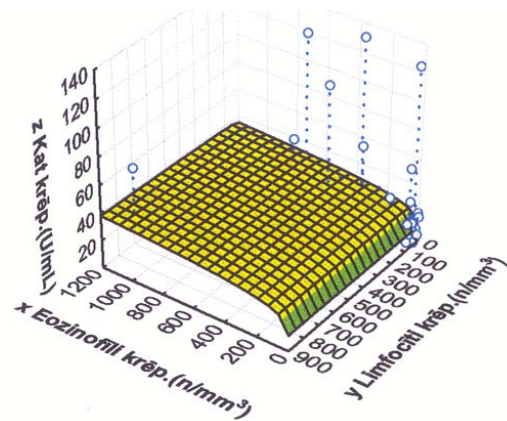
Glutaciona peroksidāzes ietekme uz katalāzes aktivitāti ( $b_2$  koeficienti) HOPS slimnieku grupai bija būtiski pozitīvi lielāka gan salīdzinājumā ar veselo cilvēku, gan astmas slimnieku grupu (sk. 25. att., leņķa apzīmējumi, attiecīgi  $p=0,00706$ ,  $p=0,00513$ ), turpretī glutaciona peroksidāzes ietekme būtiski neatšķīrās starp veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu ( $p=0,314$ ).

Krēpu supernatanta substrāta oksidējamības ietekmei uz katalāzes aktivitāti ( $b_3$  koeficienti) HOPS slimnieku grupai bija tendence būt lielākai salīdzinājumā ar veselo cilvēku grupu ( $p=0,0516$ ), bet šās ietekmes atšķirības netika novērotas ne starp HOPS un astmas slimnieku, ne veselo cilvēku un astmas slimnieku grupām (sk. 25. att., leņķa apzīmējumi, attiecīgi  $p=0,351$ ,  $p=0,572$ ).

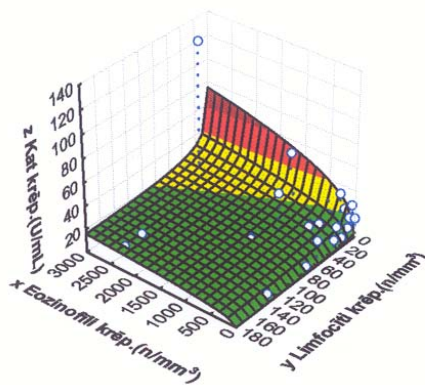
Vislabāk krēpu supernatanta katalāzes aktivitāti **bronhiālās astmas** slimniekiem var skaidrot, izmantojot divfaktoru pakāpes regresijas modeli, kas ietilpst trīsfaktoru PAKASHP modelī. Šai divfaktoru pakāpes regresijas modelī atkarīgais faktora  $z$ - katalāzes aktivitāte mainās atkarībā no neatkarīgajiem kvantitatīvajiem faktoriem:  $x$ - eozinofilo leukocītu absolūtā skaita krēpās un  $y$ - limfocītu absolūtā skaita krēpās. Savukārt, lai pārbaudītu atšķirības faktoru ietekmē starp veselu cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupām, visu šo grupu regresijas apvienotas trīsfaktoru pakāpes kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes (PAKASHP) modelī, kur ceturtais neatkarīgais kvalitatīvais faktors ir diagnoze ar trim klasēm- veseli cilvēki, HOPS un astmas slimnieki (sk. 26. att.).



Veseli cilvēki



HOPS slimnieki



Astmā slimnieki

**Veseli cilvēki**  $r=0.2864$ ,  $r^2=0.0820$ ,  $p=0.264$

$$z=10.8069*(x+1)^{0.1405}*(y+1)^{-0.04060}-1$$

$$p(b_0)<0.0000001, p(b_1)=0.112, p(b_2)=0.672$$

$$95\% \text{ interv. } 5.569<b_0<20.97$$

$$95\% \text{ interv. } -0.03442<b_1<0.3153$$

$$95\% \text{ interv. } -0.2339<b_2<0.1527$$

**HOPS slimnieki**  $r=0.3600$ ,  $r^2=0.130$ ,  $p=0.164$

$$z=11.2729*(x+1)^{0.1636}*(y+1)^{0.01300}-1$$

$$p(b_0)=0.0000182, p(b_1)=0.0604, p(b_2)=0.903$$

$$95\% \text{ interv. } 4.353<b_0<29.19$$

$$95\% \text{ interv. } -0.007669<b_1<0.3348$$

$$95\% \text{ interv. } -0.2044<b_2<0.2304$$

**Astmā slimnieki**  $r=0.5975$ ,  $r^2=0.357$ ,  $p=0.0249$

$$z=4.1805*(x+1)^{0.3624}*(y+1)^{-0.2889}-1$$

$$p(b_0)=0.0388, p(b_1)=0.0109, p(b_2)=0.0337$$

$$95\% \text{ interv. } 1.083<b_0<16.13$$

$$95\% \text{ interv. } 0.09173<b_1<0.6330$$

$$95\% \text{ interv. } -0.5536<b_2<-0.02423$$

**Visam modelim**  $r=0.4445$ ,  $r^2=0.198$ ,  $p=0.0180$

26. attēls. Krēpu eozinofilo leukocītu un limfocītu absolūtā skaita ietekme uz katalāzes aktivitāti ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem. Trīsfaktoru pakāpes kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis.

**Bronhiālās astmas** slimnieku grupā katalāzes aktivitāti krēpās būtiski pozitīvi ietekmēja eozinofilo leukocītu absolūtais skaits krēpās - faktora ietekmes īpatsvars 21,4%,  $p=0,0109$  un būtiski negatīvi limfocītu absolūtais skaits krēpās- faktora ietekmes īpatsvars 14,3%,  $p=0,0337$ . Kopējais divfaktoru pakāpes regresijas modeļa faktoru ietekmes īpatsvars astmas slimniekiem bija 35,7%,  $p=0,0249$  (sk. 26. att.).

**HOPS** slimnieku grupā pozitīvas ietekmes tendenci uz katalāzes aktivitāti krēpās izrādīja eozinofilo leukocītu absolūtais skaits ierosinātās krēpās- faktora ietekmes īpatsvars 12,9%,  $p=0,0604$ , turpretī limfocītu absolūtajam skaitam krēpās nebija būtiskas ietekmes uz katalāzes aktivitāti krēpās šai slimnieku grupai (sk. 26. att.,  $p=0,903$ ). Kopējais divfaktoru pakāpes regresijas modeļa faktoru ietekmes īpatsvars HOPS slimniekiem bija 13,0%,  $p=0,164$  (sk. 26. att.).

**Veselu** cilvēku grupā netika novērota ticama krēpu eozinofilo leukocītu un limfocītu ietekme uz katalāzes aktivitāti ierosinātās krēpās (sk. 26. att., attiecīgi  $p=0,112$  un  $p=0,672$ ).

Izmantojot trīsfaktoru PAKASHP modeli, netika konstatēta diagnozes ietekme uz katalāzes aktivitāti -  $b_0$  koeficienti ticami neatšķīrās starp pētītajām grupām.  $b_0$  koeficients raksturo, kāda būtu katalāzes aktivitāte katrā slimnieku grupā, ja būtu izslēgta pārējo faktoru (eozinofilo leukocītu un limfocītu skaita krēpās) ietekme.

Eozinofilo leukocītu absolūtā skaita krēpās ietekme uz katalāzes aktivitāti ( $b_1$  koeficienti) starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu būtiski neatšķīrās ( $p=0,850$ ). Arī eozinofilo leukocītu absolūtā skaita ietekme neatšķīrās starp veselo cilvēku un astmas slimnieku un starp HOPS un astmas slimnieku grupām (attiecīgi  $p=0,157$  un  $p=0,234$ ) jo visām trim grupām šī ietekme bija pozitīva un līdzīga, tikai astmas slimnieku grupai šī ietekme bija visvairāk izteikta (būtiska), HOPS slimnieku grupai mazāk izteikta (tendence), bet veselo cilvēku grupai vismazāk izteikta (nebūtiska).

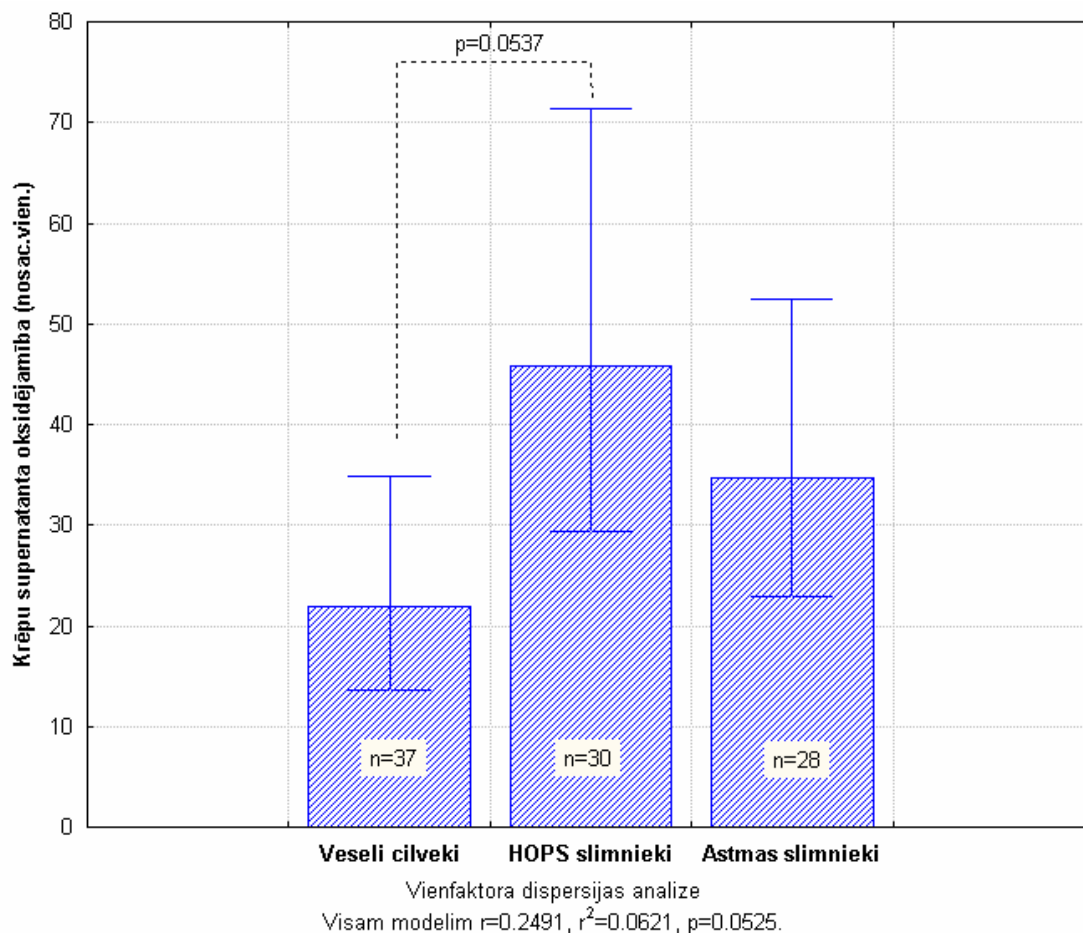
Limfocītu absolūtā skaita krēpās ietekmes uz katalāzes aktivitāti ( $b_2$  koeficienti) atšķirības tendence bija starp astmas un HOPS slimnieku grupu ( $p=0,0871$ ).

Turpretī limfocītu absolūtā skaita ietekme neatšķīrās starp veselo cilvēku un astmas slimnieku, un starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupām (attiecīgi  $p=0,121$  un  $p=0,708$ ). Kā redams 26. attēlā, ja astmas slimnieku grupai, palielinoties limfocītu skaitam, katalāzes aktivitāte mazinājās būtiski, tad abām pārējām grupām tā faktiski nemainījās.



### 2.1.3. Krēpu substrāta oksidējamība

Tā kā, izmantojot PAKASHP un PAKKA modeli, netika novērota ne mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma, ne citu kvantitatīvo faktoru ietekme uz krēpu supernatanta oksidējamību, bet tika novērota atšķirības tendence supernatanta oksidējamībai starp pētītajām cilvēku grupām ( $b_0$  koeficienti – tendence atšķirties diagnožu ietekmē), PAKKA modelis tika aizstāts ar vienfaktora NDA modeli.



**27. attēls. Ierosināto krēpu supernatanta substrāta oksidējamība veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Vienfaktora nelineārās dispersijas analīzes modelis. Lai normalizētu sadalījumu, pirms analīzes veikta logaritmiskā transformācija, pēc aprēķiniem veikta atgriezeniska eksponenciālā transformācija. Ar stabiņiem apzīmēti vidējie aritmētiskie, ar svītriņām - vidējo aritmētisko 95% reprezentācijas intervāli. Atšķirības starp atsevišķām grupām pārbaudītas, izmantojot Ņūmana-Keula testu.

Izmantojot vienfaktora NDA modeli tika novērota tendence būt palielinātai krēpu supernatanta substrāta oksidējamībai **HOPS** slimniekiem salīdzinājumā ar **veseliem** cilvēkiem (sk. 27. att.,  $p=0,0537$ ; attiecīgi 45,84 nosacītās vienības (no 29,41 līdz 71,46 nosacītām vienībām) un 21,84 nosacītās vienības (no 13,68 līdz 34,86 nosacītām vienībām)). Turpretī būtiskas atšķirības netika novērotas starp **veselu**

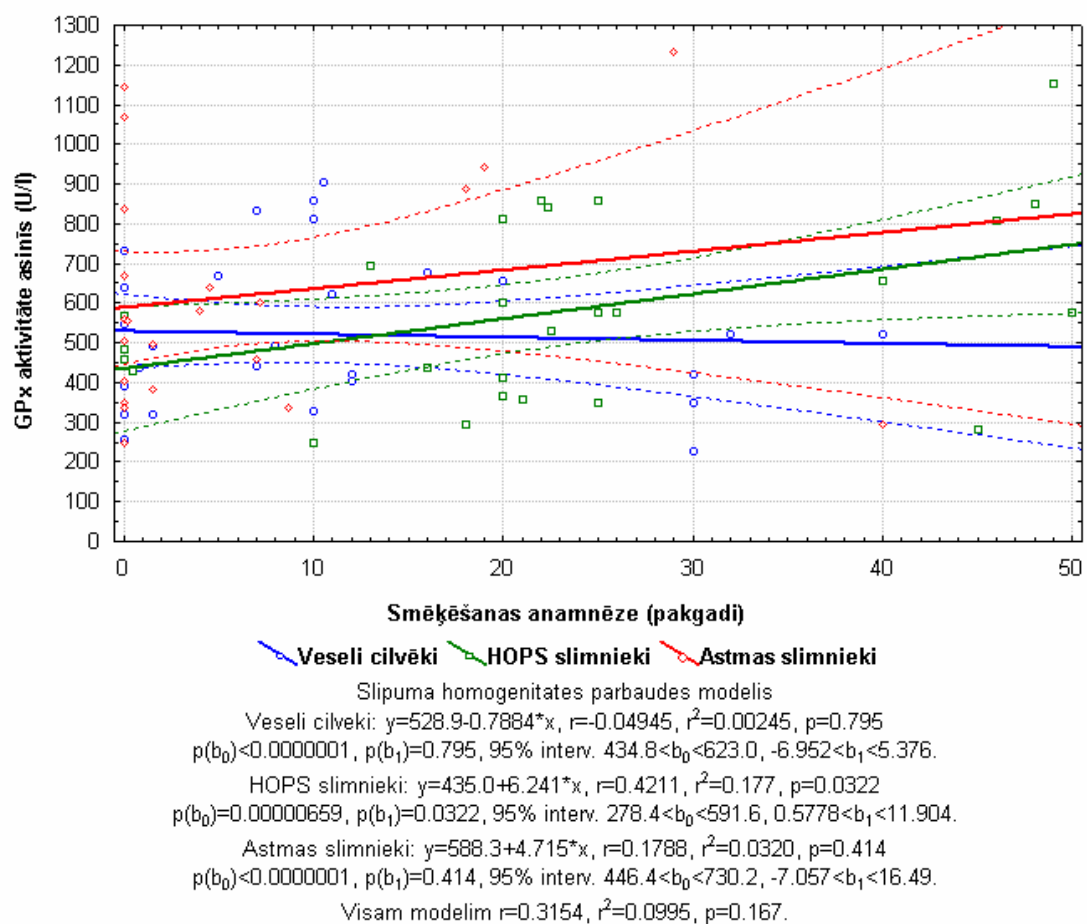


cilvēku un **bronhiālās astmas** slimnieku grupām, kā arī starp **HOPS** un **bronhiālās astmas** slimnieku grupām (sk. 27. att. astmas grupai: 34,65 nosacītās vienības (no 22,89 līdz 52,43 nosacītām vienībām)).

## 2.2. Smēķēšanas izraisītas asins plazmas antioksidatīvā statusa pārmaiņas

### 2.2.1. Glutaciona peroksidāzes aktivitāte asins plazmā

Vislabāk asins plazmas glutaciona peroksidāzes aktivitāti **HOPS** slimniekiem var skaidrot, izmantojot vienfaktora lineārās regresijas modeli, kas ietilpst divfaktoru LKASHP modelī (sk. 28. att.).



**28. attēls. Smēķēšanas ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti asins plazmā veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Divfaktoru lineārās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Ne **veseliem** cilvēkiem, ne **bronhiālās astmas** slimniekiem netika novērota būtiska mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti plazmā (sk. 28. att., attiecīgi zilie,  $p=0,795$  un sarkanie  $p=0,414$ ).

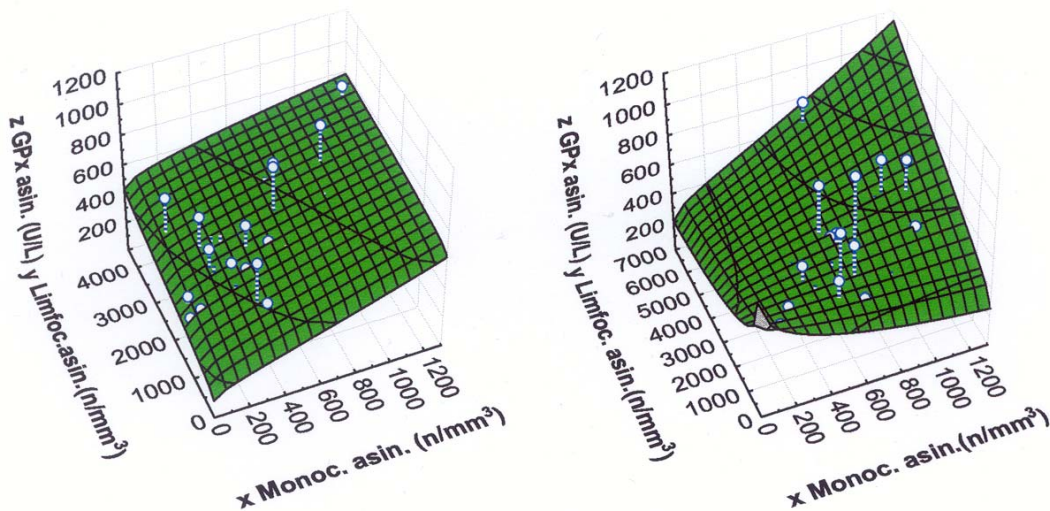
Turpretī **HOPS** slimnieku grupā atklāja būtisku glutaciona peroksidāzes aktivitātes palielināšanos mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē- faktora ietekmes īpatsvars 17,7% (sk. 28. att., zaļie,  $p=0,0322$ ).

Izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, netika konstatēta būtiska glutaciona peroksidāzes aktivitātes atšķirība starp visu trīs grupu (veselo cilvēku, HOPS un astmas slimnieku) cilvēkiem ar mazu smēķēšanas stāžu, par ko liecina līdzīgie  $b_0$  koeficienti, kas būtiski neatšķirās starp visām trim grupām (sk. 28. att., līknes pie 0 pakgadiem). Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē HOPS slimniekiem tika novērota tendence straujāk palielinājās glutaciona peroksidāzes aktivitātei salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem ( $p=0,0923$ ), uz ko norāda smēķēšanas ietekmes atšķirības tendence starp šīm grupām (starp  $b_1$  koeficientiem) (sk. 28. att., zaļā, un zilā līkne). Turpretī mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti ( $b_1$  koeficienti) starp HOPS un astmas slimnieku ( $p=0,797$ ), kā arī starp veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu būtiski neatšķirās ( $p=0,362$ , sk. 28. att., atšķirība starp zaļās un sarkanās, kā arī zilās un sarkanās līknes slīpumiem).

Vislabāk plazmas glutaciona peroksidāzes aktivitātes pārmaiņas **bronhiālās astmas** slimniekiem var skaidrot, izmantojot divfaktoru eksponenciālās regresijas modeli ar mijiedarbību, kas ietilpst trīsfaktoru EKASHP modelī. Šai divfaktoru eksponenciālās regresijas modelī ar mijiedarbību atkarīgais faktora  $z$ - glutaciona peroksidāzes aktivitāte mainās atkarībā no neatkarīgajiem kvantitatīvajiem faktoriem:  $x$  - monocītu,  $y$  - limfocītu absolūtais skaits krēpās un  $x*y$  - monocītu un limfocītu mijiedarbība. Savukārt, lai pārbaudītu atšķirības faktoru ietekmē starp veselu cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupām, visu šo grupu regresijas apvienotas trīsfaktoru eksponenciālās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes (EKASHP) modelī, kur ceturtais neatkarīgais kvalitatīvais faktors ir diagnoze ar trim klasēm - veseli cilvēki, HOPS, astma slimnieki (sk. 29. att.).

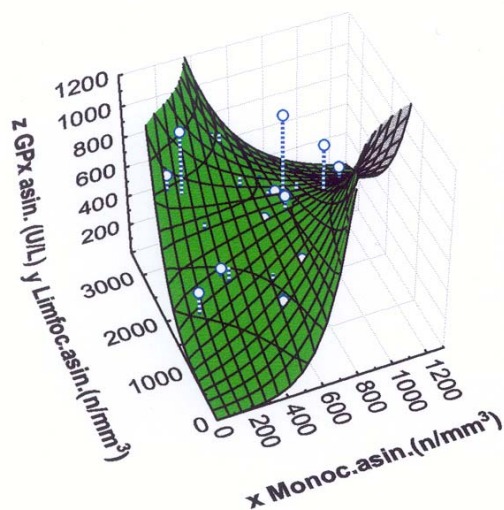
**Bronhiālās astmas** slimnieku grupā glutaciona peroksidāzes aktivitāti plazmā būtiski pozitīvi ietekmēja monocītu absolūtais skaits asinīs - faktora ietekmes īpatsvars 16,5%,  $p=0,0216$ , limfocītu absolūtais skaits asinīs - faktora ietekmes īpatsvars 20,6%,  $p=0,0114$  un būtiski negatīvi- monocītu un limfocītu absolūtā skaita asinīs mijiedarbība - mijiedarbības faktora ietekmes īpatsvars 16,1%,  $p=0,0229$  (sk. 29. att.).

Kopējais divfaktoru eksponenciālās regresijas modeļa ar mijiedarbību faktoru ietekmes īpatsvars astmas slimniekiem bija 53,2%,  $p=0,0264$  (sk. 29. att.).



Veseli cilvēki

HOPS slimnieki



Astmas slimnieki

**Veseli cilvēki:**  $r=0.2273$ ,  $r^2=0.0517$ ,  $p=0.0427$   
 $z=122.9*1.04592^{\text{sqrt}(x)}*1.01881^{\text{sqrt}(y)}*0.9995817^{(\text{sqrt}(x)*\text{sqrt}(y))}$   
 $p(b_0)=0.00160$ ,  $p(b_1)=0.477$ ,  $p(b_2)=0.510$ ,  $p(b_3)=0.738$   
 95% interv.  $7.853 < b_0 < 1922$   
 95% interv.  $0.91914 < b_1 < 1.1902$ ,  $r_1^2=0.0249$   
 95% interv.  $0.96141 < b_2 < 1.07964$ ,  $r_2^2=0.0213$   
 95% interv.  $0.997016 < b_3 < 1.002154$ ,  $r_3^2=0.00547$

**HOPS slimnieki:**  $r=0.1690$ ,  $r^2=0.0286$ ,  $p=0.617$   
 $z=800.2*0.9694^{\text{sqrt}(x)}*0.9839^{\text{sqrt}(y)}*1.0009371^{(\text{sqrt}(x)*\text{sqrt}(y))}$   
 $p(b_0)=0.00360$ ,  $p(b_1)=0.700$ ,  $p(b_2)=0.740$ ,  $p(b_3)=0.615$   
 95% interv.  $12.03 < b_0 < 53239$   
 95% interv.  $0.8206 < b_1 < 1.1452$ ,  $r_1^2=0.00827$   
 95% interv.  $0.8893 < b_2 < 1.08858$ ,  $r_2^2=0.00614$   
 95% interv.  $0.997098 < b_3 < 1.004792$ ,  $r_3^2=0.0142$

**Astmas slimnieki:**  $r=0.7294$ ,  $r^2=0.5320$ ,  $p=0.0264$   
 $z=0.03435*1.4654^{\text{sqrt}(x)}*1.2373^{\text{sqrt}(y)}*0.991681^{(\text{sqrt}(x)*\text{sqrt}(y))}$   
 $p(b_0)=0.335$ ,  $p(b_1)=0.0216$ ,  $p(b_2)=0.0114$ ,  $p(b_3)=0.0229$   
 95% interv.  $0.00002707 < b_0 < 43.59$   
 95% interv.  $1.06513 < b_1 < 2.016$ ,  $r_1^2=0.165$   
 95% interv.  $1.05567 < b_2 < 1.4501$ ,  $r_2^2=0.206$   
 95% interv.  $0.98471 < b_3 < 0.99870$ ,  $r_3^2=0.161$

**Visam modelim**  $r=0.5400$ ,  $r^2=0.292$ ,  $p=0.0357$ .

29. attēls. Asins monocītu un limfocītu absolūtā skaita un to mijiedarbības ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti asins plazmā veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem. Trīs faktoru eksponenciālās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis.

Ne **veselu** cilvēku, ne **HOPS** slimnieku grupā netika novērota ticama asins monocītu un limfocītu, kā arī to mijiedarbības ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti plazmā (sk. 29. att., attiecīgi veseliem cilvēkiem:  $p=0,477$ ,  $p=0,510$  un  $p=0,738$ , HOPS slimniekiem:  $p=0,700$ ,  $p=0,740$  un  $p=0,615$ ).

Izmantojot trīsfaktoru EKASHP modeli, astmas slimniekiem tika atklāta būtiski vājāka glutaciona peroksidāzes aktivitāte salīdzinājumā ar veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu (attiecīgi  $p=0,0250$  un  $p=0,0194$ ) -  $b_0$  koeficients mazāks astmas grupai salīdzinājumā ar veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu  $b_0$  koeficientiem.  $b_0$  koeficients raksturo, kāda būtu GPx aktivitāte katrā slimnieku grupā, ja būtu izslēgta pārējo faktoru (monocītu, limfocītu un to mijiedarbības) ietekme. Starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupām šie koeficienti būtiski neatšķīrās.

Monocītu absolūtā skaita asinīs ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti ( $b_1$  koeficienti) starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu būtiski neatšķīrās ( $p=0,452$ ), jo abas regresijas nebija būtiskas. Turpretī monocītu absolūtā skaita ietekme būtiski atšķīrās starp veselo cilvēku un astmas slimnieku grupām ( $p=0,0392$ ), kā arī starp HOPS un astmas slimnieku grupām ( $p=0,0272$ ) – ja astmas slimnieku grupai, monocītu skaitam palielinoties, būtiski pieauga arī GPx aktivitāte plazmā tad, veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupā GPx aktivitāte monocītu ietekmē būtiski nemainījās.

Limfocītu absolūtā skaita asinīs ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti ( $b_2$  koeficienti) astmas slimnieku grupai atšķīrās būtiski no veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupām (attiecīgi  $p=0,0147$  un  $p=0,0186$ ), astmas slimniekiem limfocītu skaitam pieaugot, būtiski pieauga arī GPx aktivitāte, turpretī abām pārējām grupām GPx aktivitāte ticami nemainījās. Turpretī limfocītu absolūtā skaita ietekme neatšķīrās starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu ( $p=0,517$ ) jo abas regresijas nebija būtiskas.

Monocītu un limfocītu mijiedarbības ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti ( $b_3$  koeficienti) starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu būtiski neatšķīrās ( $p=0,533$ ), jo abas regresijas nebija būtiskas. Turpretī monocītu un limfocītu mijiedarbības ietekme astmas slimnieku grupai būtiski atšķīrās gan no veselo cilvēku, gan HOPS slimnieku grupas (attiecīgi  $p=0,0263$  un  $p=0,0259$ ). Astmas slimnieku grupā atšķirībā no abām pārējām grupām šai mijiedarbībai bija būtiska negatīva ietekme uz GPx aktivitāti plazmā.

### 2.1.2. Asins plazmas substrāta oksidējamība

Ne **veseliem** cilvēkiem, ne **HOPS**, ne **bronhiālās astmas** slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski neietekmēja plazmas substrāta oksidējamību, kā arī substrāta oksidējamība būtiski neatšķīrās starp pētītajām grupām.

### 2.3. Smēķēšanas izraisītas krēpu un asins urīnvielas koncentrācijas proporcijas pārmaiņas

Tā kā urīnvielas relatīvā koncentrācija ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas asins plazmā bijas atkarīga gan no mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma, gan no krēpu ierosināšanas laika, gan no glutaciona peroksidāzes aktivitātes krēpu supernatantā, gan no glutaciona peroksidāzes aktivitātes plazmā. Savukārt glutaciona peroksidāzes aktivitāte gan krēpu supernatantā, gan plazmā bija atkarīga no izsmēķētajiem pakgadiem (neatkarīgie faktori bija savstarpēji saistīti), tāpēc šo procesu aprakstīšanai tika izmantotas četras atsevišķas divfaktoru kovariācijas analīzes, nevis viena daudzfaktoru kovariācijas analīze.

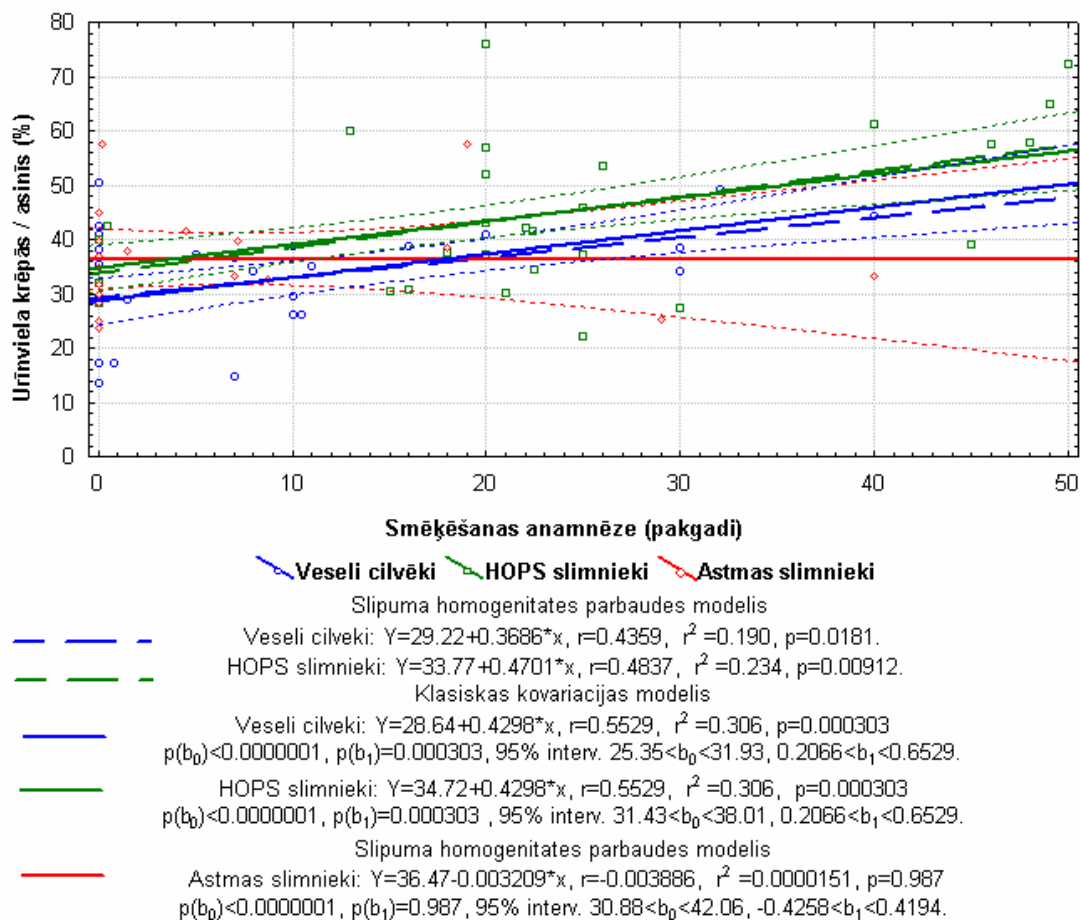
#### Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz urīnvielas attiecību

Tā kā, izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu regresijas vienādojumu virziena koeficientiem ( $b_1$  koeficienti būtiski neatšķīrās,  $p=0,660$ ) (sk. 30. att., zilā un zaļā pārtrauktās līnijas, ir paralēlas), divfaktoru LKASHP modelis tika aizstāts ar divfaktoru LKKA modeli (abām grupām aprēķina kopēju virziena koeficientu  $b_1$ , sk. 30. att., zilā un zaļā nepārtrauktā līnija).

Tāpēc gan **veseliem** cilvēkiem, gan **HOPS** slimniekiem līdzīgi mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski ( $p=0,000303$ ) palielināja urīnvielas relatīvo koncentrāciju ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā, tomēr **HOPS** slimniekiem jau ar mazu smēķēšanas stāžu, kā arī pieaugot nosmēķēto pakgadu skaitam šai urīnvielas attiecībai bija tendence būt lielākai ( $p=0,0696$ ) nekā veselo cilvēku grupā ( $b_0$  koeficientiem ir tendence atšķirties, sk. 30. att., zilā un zaļā nepārtrauktā līnija).

Turpretī **bronhiālās astmas** slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski neietekmēja ( $p=0,987$ ) urīnvielas relatīvo koncentrāciju ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā (sk. 30. att., sarkanā nepārtrauktā līnija). Astmas slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu urīnvielas relatīvā koncentrācija ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā bija

būtiski lielāka ( $p=0,0380$ ) nekā veselo cilvēku grupai, bet būtiski neatšķirās no HOPS slimnieku grupas.



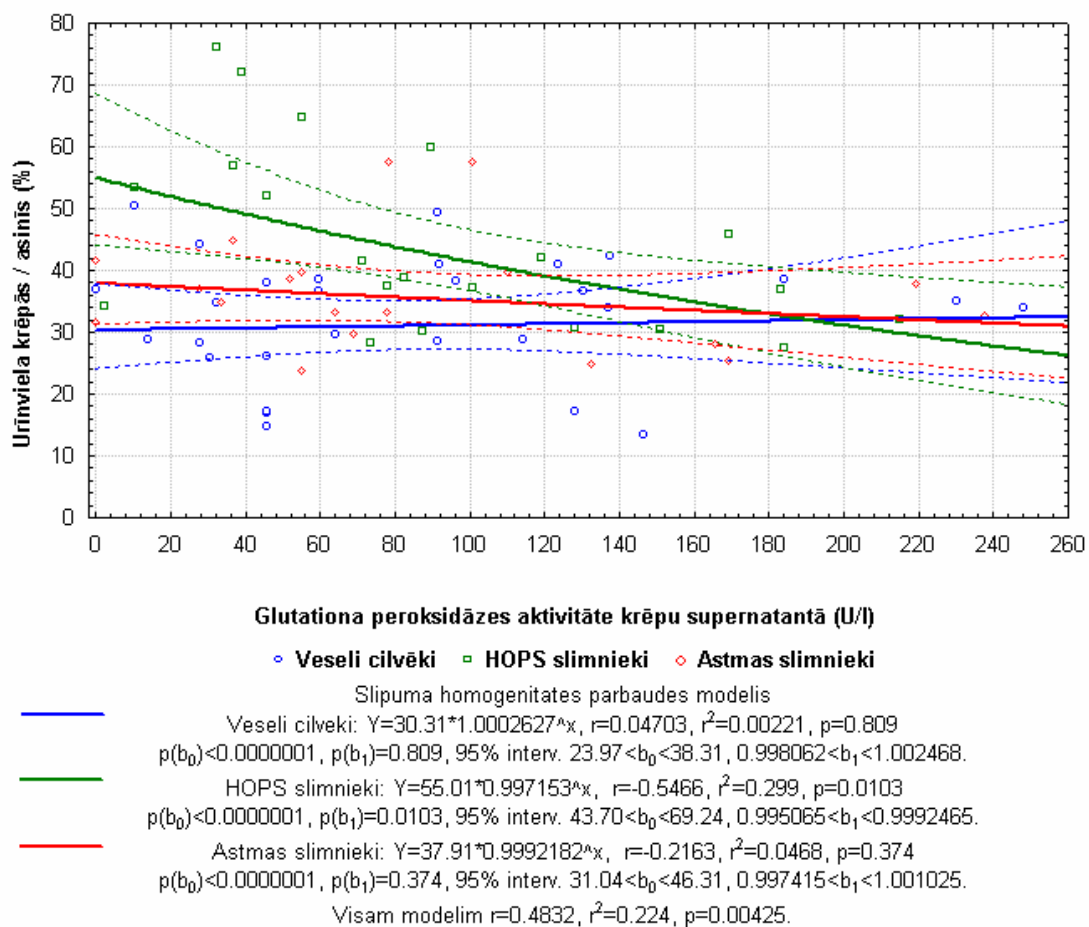
**30. attēls. Smēķēšanas ietekme uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas asins plazmā veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmēts divfaktoru lineārās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis, ar nepārtrauktām līnijām - divfaktoru lineārās klasiskās kovariācijas analīzes modelis, bet ar punktētām līnijām - šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

### Krēpu supernatanta glutaciona peroksidāzes aktivitātes ietekme uz urīnvielas attiecību

Ne veseliem cilvēkiem, ne bronhiālās astmas slimniekiem netika novērota būtiska krēpu supernatanta glutaciona peroksidāzes aktivitātes ietekme uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā (sk. 31. att., attiecīgi zilie,  $p=0,809$  un sarkanie,  $p=0,374$ ).

Turpretī HOPS slimnieku grupā atklāja būtisku urīnvielas attiecības mazināšanos krēpu supernatanta GPx aktivitātes ietekmē (sk. 31. att., zaļie,  $p=0,0103$ ).

Izmantojot divfaktoru EKASHP modeli, tika konstatēts, ka urīnvielas relatīvā koncentrācija ierosinātās krēpās procentos no urīnvielās koncentrācijas plazmā HOPS slimniekiem ar vāju krēpu supernatanta GPx aktivitāti ir būtiski palielināta salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem ar vāju krēpu supernatanta GPx aktivitāti ( $p=0,000936$ ), kā arī salīdzinājumā ar bronhiālās astmas slimniekiem ar vāju krēpu supernatanta GPx aktivitāti, par ko liecina  $b_0$  koeficientu atšķirība starp šīm grupām ( $p=0,0147$ ), turpretī starp veseliem cilvēkiem ar vāju krēpu supernatanta GPx aktivitāti un astmas slimniekiem ar vāju krēpu supernatanta GPx aktivitāti netika novērota būtiska urīnvielas attiecības atšķirība ( $p=0,168$ ) (sk. 31. att., līknes pie tuvu nullei esošas GPx aktivitātes).



**31. attēls. Krēpu supernatanta glutaciona peroksidāzes aktivitātes ietekme uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas asins plazmā veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Divfaktoru eksponentcālās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

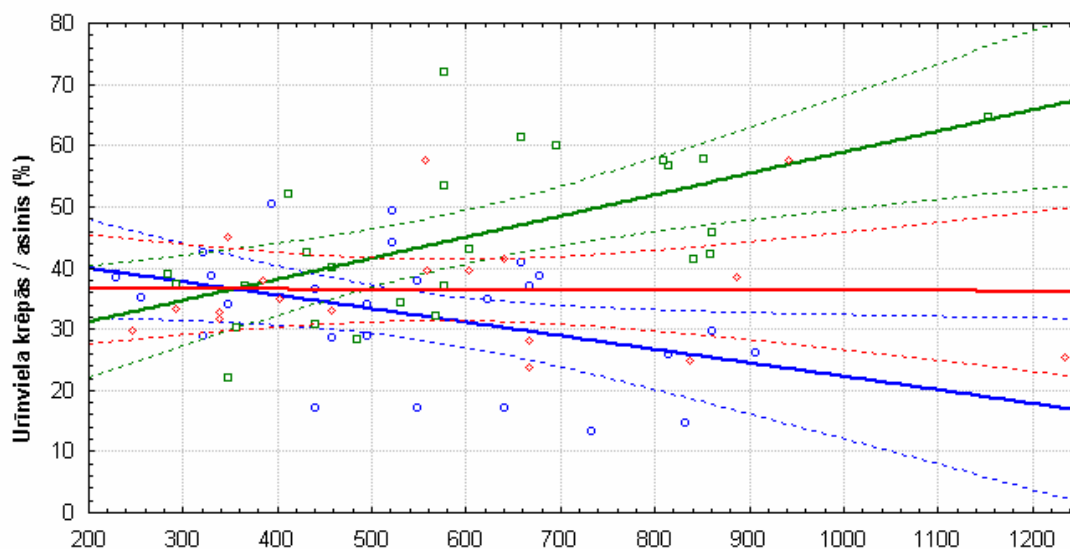
Krēpu supernatanta GPx aktivitātei palielinoties, HOPS slimniekiem krēpu, asins urīnvielas attiecībai bija straujāka samazināšanās tendence nekā veseliem



cilvēkiem ( $p=0,0510$ ), uz ko norāda atšķirības tendence starp šo grupu krēpu supernatanta GPx ietekmi (starp  $b_1$  koeficientiem, sk. 31. att., zaļās un zilās līknes atšķirīgie slīpumi). Turpretī krēpu supernatanta GPx ietekme uz urīnvielas attiecību ( $b_1$  koeficienti) starp veselo cilvēku un astmas slimnieku, kā arī starp HOPS un astmas slimnieku grupām būtiski neatšķirās ( $p=0,545$ ) (sk. 31. att., līkņu slīpumi neatšķirās starp zilo un sarkano, kā arī starp zaļo un sarkano līkni, attiecīgi  $p=0,480$  un  $p=0,125$ ).

### Asins plazmas glutaciona peroksidāzes aktivitātes ietekme uz urīnvielas attiecību

Veseliem cilvēkiem plazmas GPx aktivitātes ietekmē novēroja būtisku urīnvielas relatīvās koncentrācijas vājināšanos ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā (sk. 32. att., zilie,  $p=0,0367$ ).



#### Glutaciona peroksidāzes aktivitāte asins plazmā (U/L)

— Veseli cilvēki — HOPS slimnieki — Astmas slimnieki

Slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis

Veseli cilvēki:  $Y=44.36-0.02211 \cdot x$ ,  $r=-0.4115$ ,  $r^2=0.169$ ,  $p=0.0367$   
 $p(b_0)<0.0000001$ ,  $p(b_1)=0.0367$ , 95% interv.  $32.55<b_0<56.17$ ,  $-0.04274<b_1<-0.001479$ .

HOPS slimnieki:  $Y=24.34+0.03457 \cdot x$ ,  $r=0.5919$ ,  $r^2=0.350$ ,  $p=0.00183$   
 $p(b_0)=0.000674$ ,  $p(b_1)=0.00183$ , 95% interv.  $11.52<b_0<37.16$ ,  $0.01426<b_1<0.05487$ .

Astmas slimnieki:  $Y=36.634-0.0004 \cdot x$ ,  $r=-0.01024$ ,  $r^2=0.000105$ ,  $p=0.968$   
 $p(b_0)=0.0000107$ ,  $p(b_1)=0.968$ , 95% interv.  $24.30<b_0<48.97$ ,  $-0.01989<b_1<0.01914$ .

Visam modelim  $r=0.6147$ ,  $r^2=0.378$ ,  $p=0.0000114$ .

**32. attēls. Asins plazmas glutaciona peroksidāzes aktivitātes ietekme uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas asins plazmā veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Divfaktoru lineārās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.



**HOPS** slimniekiem palielināta plazmas GPx aktivitāte bija saistīta ar būtisku urīnvielas relatīvās koncentrācijas palielināšanos ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā (sk. 32. att., zaļie,  $p=0,00183$ ).

**Bronhiālās astmas** slimniekiem nenovēroja būtiskas pārmaiņas urīnvielas attiecībā plazmas GPx aktivitātes ietekmē (sk. 32. att., sarkanie,  $p=0,968$ ).

Izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, tika konstatēts, ka urīnvielas relatīvā koncentrācija ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā HOPS slimniekiem ar vāju asins plazmas GPx aktivitāti ir būtiski mazāka nekā veseliem cilvēkiem ar vāju plazmas GPx aktivitāti ( $p=0,0218$ ), par ko liecina  $b_0$  koeficientu atšķirības starp šīm grupām, turpretī starp HOPS slimniekiem ar vāju plazmas GPx aktivitāti un astmas slimniekiem ar vāju plazmas GPx aktivitāti, kā arī starp veseliem cilvēkiem ar vāju plazmas GPx aktivitāti un astmas slimniekiem ar vāju plazmas GPx aktivitāti netika novērota būtiska urīnvielas relatīvās koncentrācijas atšķirība (attiecīgi  $p=0,158$ , kā arī  $p=0,347$ ).

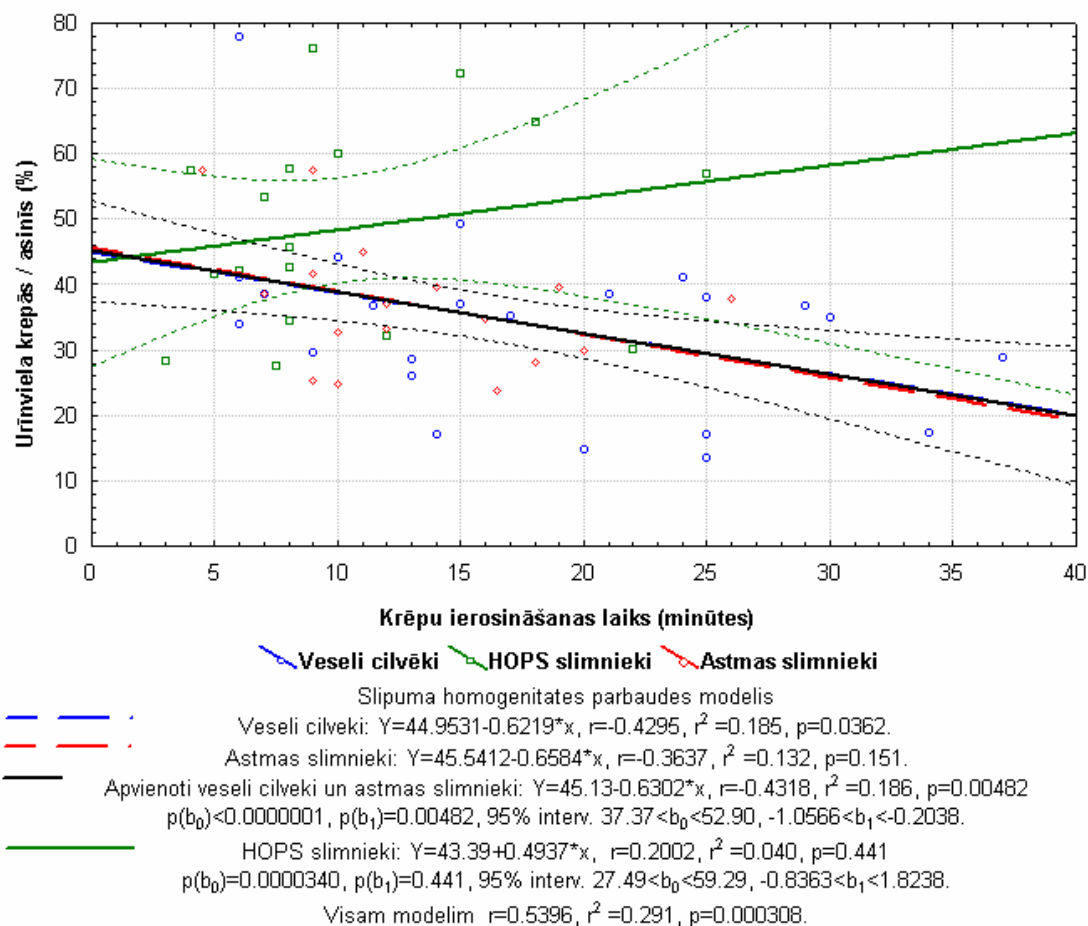
Plazmas GPx aktivitātes ietekme uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā HOPS slimniekiem būtiski atšķīrās no veseliem cilvēkiem ( $p=0,000207$ ): ja veseliem cilvēkiem mazinājās urīnvielas relatīvā koncentrācija palielinoties GPx aktivitātei, tad HOPS slimniekiem urīnvielas relatīvā koncentrācija pieauga, palielinoties GPx aktivitātei (atšķirības starp  $b_1$  koeficientiem sk. 32. att., zilās un zaļās līknes atšķirīgie slīpumi). Tika rī novērota atšķirība plazmas GPx ietekmē uz urīnvielas attiecību ( $b_1$  koeficienti) starp HOPS un astmas slimnieku grupām, bet starp veselo cilvēku un astmas slimnieku grupām atšķirība nebija būtiska (sk. 32. att., līkņu slīpumu atšķirība starp zaļo un sarkano, kā arī starp zilo un sarkano līkni, attiecīgi  $p=0,0136$  un  $p=0,117$ ).

#### **Krēpu ierosināšanas laika ietekme uz urīnvielas attiecību**

**Veseliem** cilvēkiem novēroja būtisku urīnvielas koncentrācijas mazināšanos ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā, palielinoties krēpu ierosināšanas laikam (sk. 33. att., zilā pārtrauktā līnija,  $p=0,0362$ ). Arī **astmas** slimniekiem bija urīnvielas relatīvās koncentrācijas mazināšanās krēpās ierosināšanas laika ietekmē, lai gan šī mazināšanās nebija statistiski ticama (sk. 33. att., sarkanā pārtrauktā līnija,  $p=0,151$ ).

Tā kā, izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu regresijas vienādojumiem (gan  $b_0$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,949$ , gan  $b_1$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,950$ ), matemātiski

šīs abas grupas var apvienot vienā grupā (veselo cilvēku un astmas slimnieku grupā) un aprakstīt ar vienu regresijas vienādojumu ar lielu ticamību ( $p=0,00482$ , sk. 33. att., melnā nepārtrauktā līnija). Tas norāda, ka veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem, jo ilgāk tiek ierosinātas krēpas, jo zemāka ir relatīvā urīnvielas koncentrācija inducētajās krēpās procentos no tās koncentrācijas asins plazmā.



**33. attēls. Krēpu ierosināšanas laika ietekme uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju ierosinātās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas asins plazmā veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī kopā apvienotiem veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmētas veselu cilvēku un astmas slimnieku grupas pirms apvienošanas, ar nepārtrauktām līnijām - izveidotais divfaktoru lineārās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētu līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Turpretī **HOPS** slimniekiem nenovēroja būtiskas urīnvielas relatīvās koncentrācijas pārmaiņas ierosinātās krēpās procentos no koncentrācijas plazmā atkarībā no krēpu ierosināšanas laika (sk. 33. att., zaļā nepārtrauktā līnija  $p=0,441$ ).

Izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, neizdevās atrast būtiskas atšķirības urīnvielas relatīvajā koncentrācijā starp HOPS slimnieku un apvienoto veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu īslaicīgas krēpu ierosināšanas gadījumā ( $b_0$  koeficientu

atšķirība starp grupām nebija būtiska,  $p=0,815$ , – melnās un zaļās līknes faktiski iziet no viena punkta  $X$  koordinātu sākumpunktā, sk. 33. att.). Turpretī atšķirība krēpu ierosināšanas laika ietekmei uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju starp HOPS slimnieku un apvienoto veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu bija būtiska (taisnes virziena koeficienti -  $b_1$  starp abām grupām atšķīrās būtiski,  $p=0,0484$ ). Ja veselo cilvēku un astmas slimnieku grupai urīnvielas relatīvā koncentrācija ticami mazinājās, tad HOPS slimnieku grupai tā nemainījās (pat nedaudz nebūtiski palielinājās), palielinoties krēpu ierosināšanas laikam.

#### **2.4. Smēķēšanas izraisītas alfa-1 antiproteāzes koncentrācijas pārmaiņas asins plazmā**

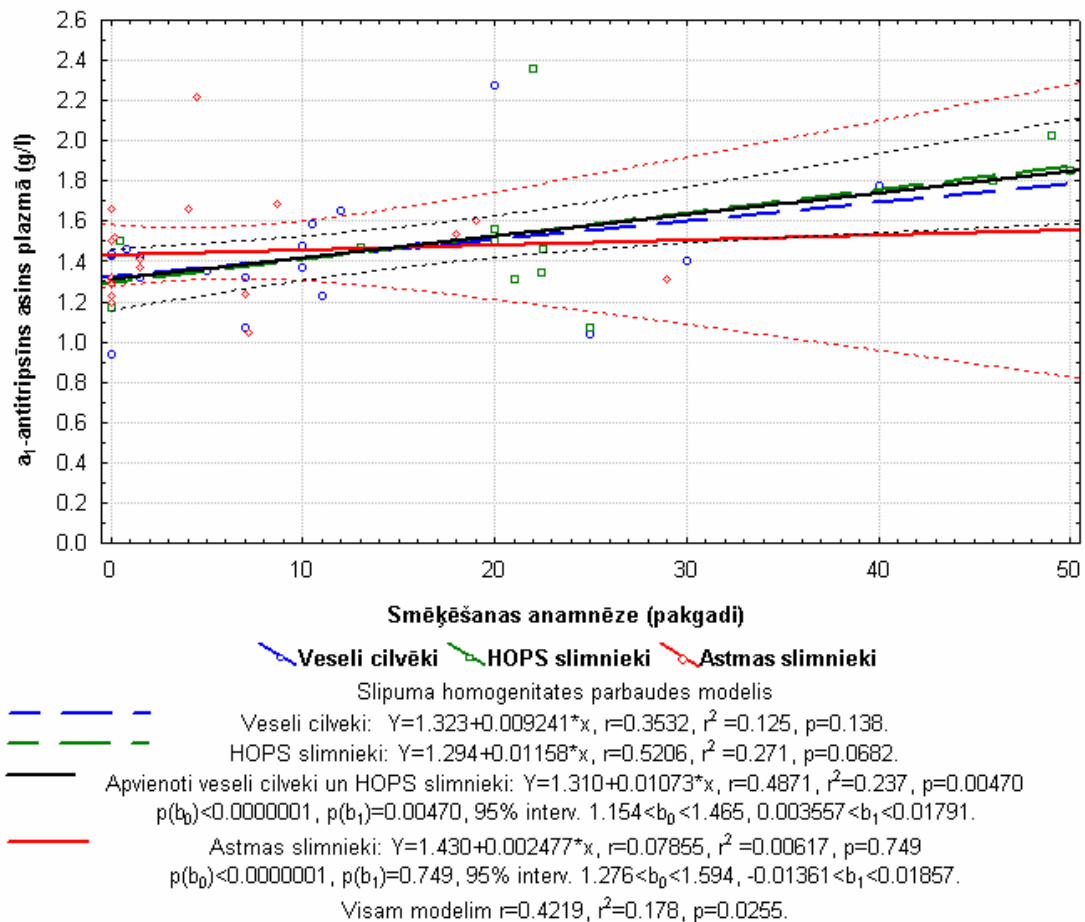
HOPS slimniekiem novēroja  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas palielināšanās tendenci asins plazmā mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē (sk. 34. att., zaļā pārtrauktā līnija,  $p=0,0682$ ). Arī **veseliem** cilvēkiem  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija palielinājās mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē, lai gan tā nebija statistiski ticama (sk. 34. att., zilā pārtrauktā līnija,  $p=0,138$ ).

Tā kā, izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, nenovēroja būtiskas atšķirības starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu regresijas vienādojumiem (gan  $b_0$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,870$ , gan  $b_1$  koeficienti neatšķīrās,  $p=0,778$ ), kā arī abas regresijas bija ar līdzīgu ticamību, matemātiski abas šīs grupas var apvienot vienā grupā (veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupā) un aprakstīt ar vienu regresijas vienādojumu ar lielāku ticamību ( $p=0,00470$ , sk. 34. att., melnā nepārtrauktā līnija). Tas norāda, ka veseliem cilvēku un HOPS slimniekiem, jo lielāks ir izsmēķēto pakgadu skaits, jo lielāka plazmas  $\alpha_1$ - antitripsīna koncentrācija.

Turpretī **astmas** slimniekiem nenovēroja būtiskas plazmas  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas pārmaiņas mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē (sk. 34. att., sarkanā nepārtrauktā līnija,  $p=0,749$ ).

Izmantojot divfaktoru LKASHP modeli, neizdevās atrast būtiskas atšķirības plazmas  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijā starp astmas slimnieku un apvienoto veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu smēķētājiem ar mazu stāžu ( $b_0$  koeficientu atšķirība starp grupām nebija būtiska,  $p=0,267$ ). Arī plazmas  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija veselu cilvēku un HOPS slimnieku apvienotajā grupā kaut arī ticami palielinājās, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam, tomēr  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas pieaugums nebija statistiski ticami straujāks par astmas slimnieku

grupā novēroto nebūtisko pieaugumu ( $b_1$  koeficientu atšķirība starp šīm grupām,  $p=0,348$ ).



**34. attēls. Smēķēšanas ietekme uz  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrāciju asins plazmā veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem, kā arī kopā apvienotiem veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem.** Ar pārtrauktām līnijām apzīmētas veselu cilvēku un HOPS slimnieku grupas pirms apvienošanas, ar nepārtrauktām līnijām - izveidotais divfaktoru lineārās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētu līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

#### **Neitrofilo leukocītu skaita ierosinātās krēpās ietekme uz alfa-1 antitripsīna koncentrāciju asins plazmā**

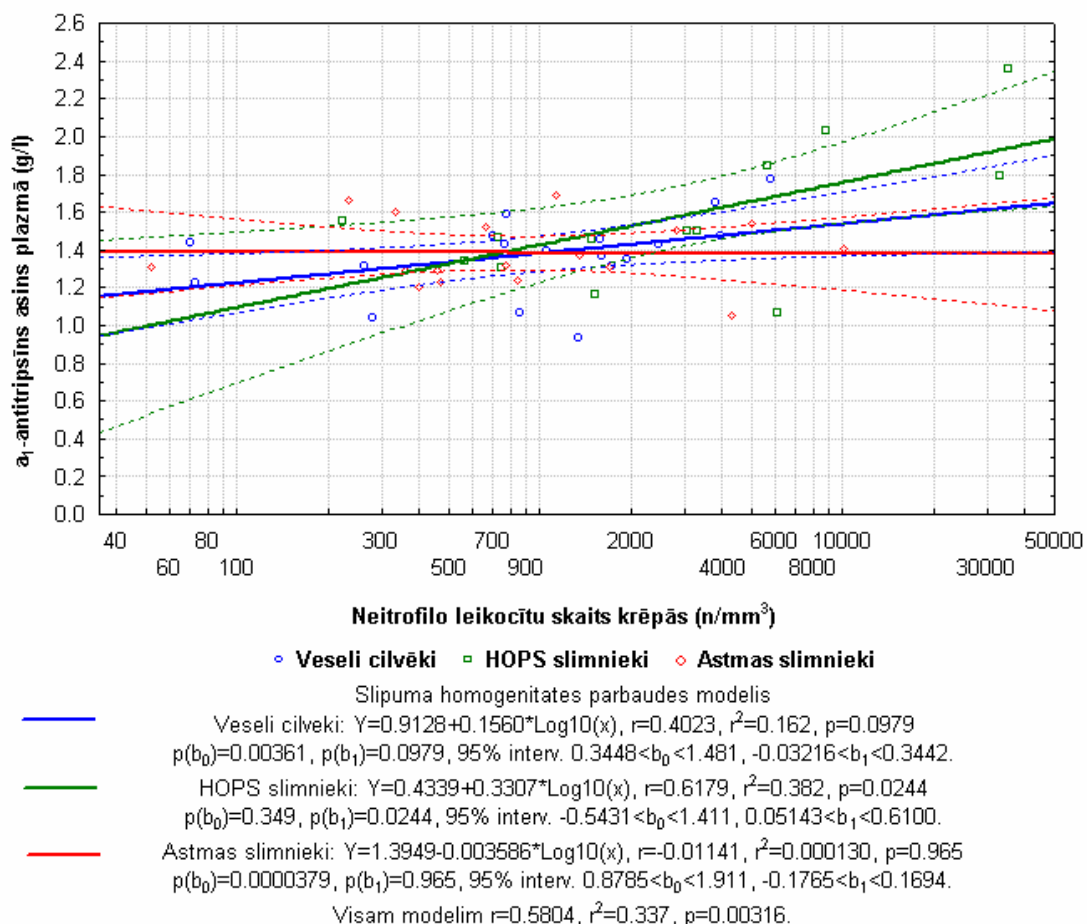
Arī **veseliem** cilvēkiem konstatēja  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas palielināšanās tendenci palielinoties neitrofilo leukocītu skaitam ierosinātās krēpās (sk. 35. att., zilā līnija,  $p=0,0979$ ).

Turpretī **astmas** slimniekiem nebija būtiskas plazmas  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas pārmaiņas atkarībā no neitrofilo leukocītu absolūtā skaita ierosinātās krēpās (sk. 35. att., sarkanā līnija,  $p=0,965$ ).

Izmantojot divfaktoru LGKASHP modeli, tika konstatēts, ka  $\alpha_1$ -antitripsīna

koncentrācijai plazmā HOPS slimniekiem ar mazu neitrofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās ir tendence būt zemākai nekā astmas slimniekiem, par ko liecina  $b_0$  koeficientu atšķirības starp šīm grupām ( $p=0,0534$ ), turpretī starp veseliem cilvēkiem ar mazu neitrofilo leukocītu skaitu un astmas slimniekiem ar mazu neitrofilo leukocītu skaitu, kā arī starp veseliem cilvēkiem ar mazu neitrofilo leukocītu skaitu un HOPS slimniekiem ar mazu neitrofilo leukocītu skaitu netika novērotas būtiskas atšķirības  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijā (sk. 35. att., līknes sākumā kur mazs neitrofilo leukocītu skaits, attiecīgi  $p=0,192$  un  $p=0,337$ ).

**HOPS** slimniekiem konststēja  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas palielināšanos plazmā, palielinoties neitrofilo leukocītu skaitam ierosinātās krēpās (sk. 35. att., zaļā līnija,  $p=0,0244$ ).



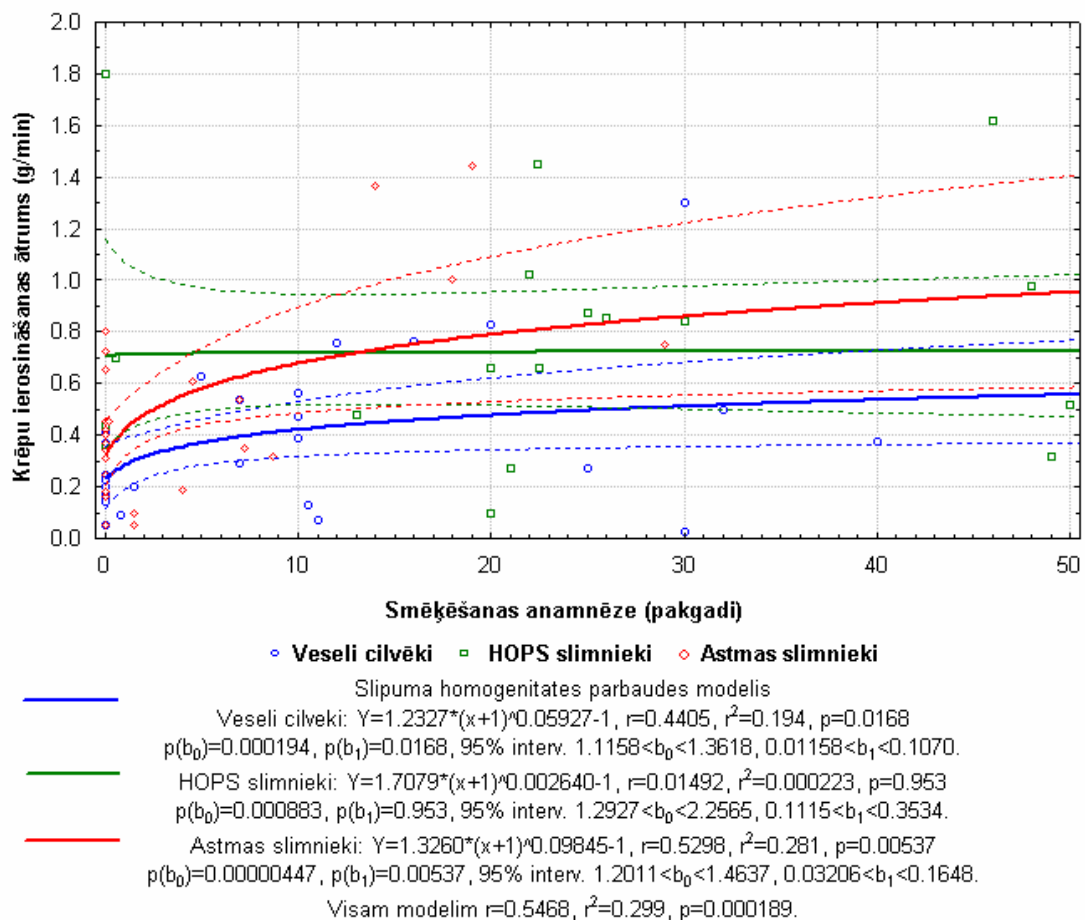
**35. attēls. Neitrofilo leukocītu absolūtā skaita krēpās ietekme uz  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrāciju asins plazmā veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Divfaktoru logaritmiskās kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Palielinoties neitrofilo leukocītu skaitam ierosinātās krēpās  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija plazmā HOPS slimnieku grupā palielinājās būtiski straujāk nekā

bronhiālās astmas slimnieku grupā ( $p=0,0308$ ), uz ko norāda būtiskā atšķirība starp šo grupu  $b_1$  koeficientiem (sk. 35. att., atšķirība starp zaļās un sarkanās līknes slīpumu). Turpretī neitrofilo leukocītu skaita ietekme uz  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrāciju plazmā ( $b_1$  koeficienti) starp veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu, kā arī starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu būtiski neatšķirās (sk. 35. att., starpība starp zilās un sarkanās līknes,  $p=0,195$ , kā arī starp zilās un zaļās līknes slīpumu,  $p=0,256$ ).

### 3. Smēķēšanas izraisītas krēpu ierosināšanas ātruma pārmaiņas

Gan **veseliem** cilvēkiem, gan **bronhiālās astmas** slimniekiem mūžā izsmēķētās tabakas daudzums būtiski palielināja krēpu ierosināšanas ātrumu (sk. 36. att., zilie un sarkanie,  $p=0,0168$  un  $p=0,00537$ ).



**36. attēls. Smēķēšanas ietekme uz krēpu ierosināšanas ātrumu veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.** Divfaktoru pakāpes kovariācijas analīzes slīpuma homogenitātes pārbaudes modelis. Ar punktētām līnijām apzīmētas šā modeļa regresiju 95% reprezentācijas zonas.

Turpretī **HOPS** slimniekiem mūžā izsmēķēto pakgadu skaits krēpu ierosināšanas ātrumu būtiski neietekmēja (sk. 36. att., zaļie,  $p=0,953$ ).

Izmantojot divfaktoru PAKASHP modeli, tika konstatēts, ka krēpu

ierosināšanas ātrums HOPS slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu ir būtiski palielināts salīdzinājumā ar veselīgiem cilvēkiem ar mazu smēķēšanas stāžu ( $p=0,0101$ ), kā arī salīdzinājumā ar bronhiālās astmas slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu, par ko liecina  $b_0$  koeficientu atšķirības starp šīm grupām ( $p=0,0493$ ), turpretī starp veselīgiem cilvēkiem ar mazu smēķēšanas stāžu un astmas slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu netika novērota būtiska atšķirība ( $p=0,292$ ) (sk. 36. att., līknes pie 0 pakgadiem).

Mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē bronhiālās astmas slimnieku krēpu ierosināšanas ātrumam bija tendence palielināties straujāk nekā HOPS slimnieku krēpu ierosināšanas ātrumam ( $p=0,0778$ ), uz ko norāda atšķirības tendence starp šo grupu smēķēšanas ietekmi (starp  $b_1$  koeficientiem) (sk. 36.att., sarkanā un zaļā līkne). Turpretī mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz krēpu ierosināšanas ātrumu ( $b_1$  koeficienti) starp veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu, kā arī starp veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu būtiski neatšķīrās (sk. 36. att., starpība starp zilās un sarkanās,  $p=0,321$ , kā arī starp zilās un zaļās  $p=0,219$ , līknes slīpumu).

## Diskusija

### 1. Citoloģiskie raksturlielumi

#### 1.1. Kopējais šūnu skaits

Mūsu pētījumā netika novērotas ticamas atšķirības kopējā šūnu skaitā ierosinātās krēpās (te un turpmāk nav iekļauts plakanais epitēlijs) un leukocītu skaitā venozajās asinīs starp nesmēķējošu un mazsmēķējošu veselu cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupām. HOPS slimnieku grupai konstatēja ticamu kopējā šūnu skaita palielināšanos ierosinātās krēpās, palielinoties mūža izsmēķētajam pakgadu skaitam. HOPS slimniekiem šī smēķēšanas ietekme būtiski atšķīrās no astmas slimniekiem, kam, palielinoties izsmēķēto pakgadu skaitam, kopējais šūnu skaits pat nedaudz mazinājās, lai gan nebūtiski. Arī veselo cilvēku grupā, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam, novēroja nebūtisku kopējā šūnu skaita palielināšanos ierosinātās krēpās. Arī citi autori nav atraduši ticamas atšķirības kopējā šūnu skaitā ierosinātās krēpās starp veseliem cilvēkiem, astmas un HOPS slimniekiem, tāpat kā mūsu pētījumā starp nesmēķējošu un mazsmēķējošu veselu cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupām [26, 182, 310, 469]. Tomēr atšķirībā no mūsu pētījuma viņi nebija ņēmuši vērā smēķēšanas anamnēzi par kovarianti, bet aprēķinājuši vienkārši vidējo aritmētisko no visas grupas. Kā mēs novērojām, atšķirības kopējā šūnu skaitā starp diagnozēm parādās tikai smēķēšanas un diagnozes mijiedarbībā ja ir liels nosmēķēto pakgadu skaits, kur HOPS slimnieku grupā smēķēšanas ietekmē būtiski pieaug kopējais šūnu skaits ierosinātās krēpās, bet astmas slimnieku grupā tas pat nedaudz nebūtiski mazinās. Arī Balzāno norāda, ka veseliem smēķētājiem ir tendence palielināties kopējam šūnu skaitam ierosinātās krēpās, salīdzinot ar nesmēķētājiem, bet nenovēro šādu tendenci HOPS slimnieku grupai [26]. Savukārt Vignola novērojis kopējā šūnu skaita palielināšanās tendenci HOPS slimnieku grupai [516], bet Kajembe atklāj būtiski palielinātu kopējo šūnu skaitu HOPS slimnieku grupai salīdzinājumā ar veselo cilvēku grupu [263]. Arī BAL šķidrumā veseliem smēķētājiem Morisons konstatējis būtiski palielinātu kopējo šūnu skaitu salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [339].

Kā redzams, kopējā šūnu skaita adekvātai vērtēšanai vēlams ne tikai vienkārši salīdzināt atsevišķas pacientu grupas, bet vienlaikus ņemt arī vērā izsmēķēto cigarešu



skaitu par kovarianti jo mēs esam konstatējuši, ka atšķirības starp pacientu grupām parādās tikai liela smēķēšanas stāža gadījumā.

Venozajās asinīs gan HOPS slimnieku gan veselo cilvēku un astmas slimnieku grupai ticami palielinājās kopējais leukocītu skaits, palielinoties izsmēķēto pakgadu skaitam. Pie kam veselo cilvēku un astmas slimnieku grupās kopējais leukocītu skaits smēķēšanas ietekmē palielinājās vienādi, turpretī HOPS slimnieku grupā leukocītu skaitam bija tendence pieaugt straujāk nekā abās pārējās grupās. Bez tam asinīs kopējais leukocītu skaits palielinājās lineārā atkarībā no mūžā izsmēķētā pakgadu skaita, bet krēpās kopējā šūnu skaita pieaugumam atkarībā no pakgadu skaita bija eksponenciāls raksturs - palielinoties pakgadu skaitam, HOPS slimniekiem arvien straujāk palielinājās kopējais šūnu skaits.

Šī kopējā šūnu skaita palielināšanās ierosinātās krēpās un kopējā leukocītu skaita palielināšanās asinīs izsmēķēto pakgadu skaita ietekmē, īpaši HOPS slimniekiem, skaidrojama ar pārsvarā neitrofilo leukocītu absolūtā skaita palielināšanos ierosinātās krēpās un venozajās asinīs smēķēšanas dēļ.

## 1.2. Bronhu epitēlijšūnas

Mūsu pētījumā, gan veseliem cilvēku, gan HOPS slimniekiem vienādi, mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē, būtiski mazinājās bronhu epitēlijšūnu relatīvais skaits ierosinātās krēpās. Savukārt bronhiālās astmas slimniekiem šāda ticama bronhu epitēlijšūnu relatīvā skaita mazināšanās netika novērota.

Visām pētītajām veselo cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupām vienādi un būtiski mazinājās bronhu epitēlijšūnu absolūtais skaits ierosinātās krēpās, palielinoties mūžā izsmēķēto pakgadu skaitam, pie kam arī 0 pakgadu gadījumā tas neatšķīrās starp grupām.

Netika novērota bronhu epitēlijšūnu relatīvā un absolūtā skaita ticama atšķirība starp nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem veseliem cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.

Arī citi autori neatklāja ticamas atšķirības ierosināto krēpu un spontāno krēpu bronhu epitēlijšūnu relatīvajā skaitā starp veselu nesmēķētāju, bronhiālās astmas un HOPS slimnieku grupām [26, 182, 516], lai gan atšķirībā no mūsu pētījuma arī starp veseliem nesmēķētājiem un veseliem smēķētājiem šie autori nenovēroja būtisku atšķirību [26, 516]. Turpretī mūsu pētījumā, palielinoties izsmēķētajam tabakas daudzumam (pakgadiem), arī veseliem cilvēkiem mazinās bronhu epitēlijšūnu

relatīvais skaits. Šī atšķirība iespējams skaidrojama ar to, ka iepriekš minētie autori dalīja veselos cilvēkus diskreti - smēķētājos un nesmēķētājos, neņemot vērā katra izsmēķētos pakgādus, tāpēc varēja stipri palielināties izkliede, turpretī mūsu pētījumā izsmēķētie pakgadi tika ņemti vērā par kovarianti. Tieši šis smēķēšanas faktors, nevis diagnoze, bija būtisks. Arī pētījumos, kuros nav izdalīti atsevišķi smēķētāji, bet salīdzinātas veselo cilvēku, astmas un HOPS slimnieku grupas, nav atklātas būtiskas bronhu epitēlijšūnu relatīvā skaita atšķirības starp šīm grupām [310, 469]. Citi autori savukārt norāda uz būtiski palielinātu bronhu epitēlijšūnu absolūto skaitu astmas slimnieku ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar HOPS slimniekiem, bet tas astmas slimniekiem neatšķiras no veseliem cilvēkiem [310]. Lai gan šai pētījumā viņi visās grupās bija iekļāvuši gan smēķētājus, gan nesmēķētājus, bet, neņemot vērā izsmēķētos pakgādus par kovarianti, šo atšķirību starp astmas un HOPS slimnieku grupām varbūt var skaidrot ar atšķirīgo smēķējošo pacientu skaitu grupās un izsmēķēto pakgadu skaitu. Jo HOPS grupā Luī u.c. pētījumā no 15 pacientiem bija 10 smēķētāji ar vairāk nekā 20 pakgadu stāžu, bet astmas slimnieku grupā no 17 cilvēkiem bija tikai 2 smēķētāji ar 7 un 12 pakgadu stāžu [310]. Kā izriet no mūsu pētījuma, jo vairāk pakgadu nosmēķēts, jo mazāk bronhu epitēlijšūnu skaits ierosinātās krēpās neatkarīgi no diagnozes. Citi autori atšķirībā no mums novēroja būtiski palielinātu bronhu epitēlijšūnu relatīvo skaitu astmas slimnieku ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem [69, 482].

Mūsu pētījumā novēroto bronhu epitēlijšūnu absolūtā skaita mazināšanos visām trim pētītajām pacientu grupām un relatīvā skaita mazināšanos veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupai ierosinātās krēpās, palielinoties izsmēķēto pakgadu skaitam, var skaidrot ar vairākiem mehānismiem. Pirmkārt, smēķēšanas dēļ attīstās bronhu gļotu dziedzeru hiperplāzija [317], palielinās kausšūnu skaits elpceļu epitēlijā [145, 312, 317, 413, 417, 432, 472, 501, 537], kā arī bronhu asinsvadu endotēlija un bronhu epitēlija caurlaidība [339, 423, 516], tāpēc pieaug gļotu producēšana un plazmas eksudācija [317]. Tas savukārt palielina spontāno krēpu produkcēšanu un atklepošana, tāpēc nlobītās bronhu epitēlijšūnas tiek straujāk izvadītas no bronhiem, un to koncentrācija smēķētājiem ar lielu stāžu ierosinātās krēpās ir vājāka nekā nesmēķētājiem un mazsmēķētājiem. Otrkārt, smēķētājiem ar lielāku mūžā izsmēķētās tabakas daudzumu (veseliem cilvēku un astmas slimniekiem), kā arī visiem HOPS slimniekiem mēs novērojām palielinātu krēpu ierosināšanas ātrumu, ko izskaidro pastiprinātā gļotu producēšana no gļotu dziedzeriem un kausšūnām, kā arī plazmas

eksudācija, par ko liecina arī mūsu pētījumā konstatētā urīnvielas relatīvās koncentrācijas palielināšanās ierosinātās krēpās, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem. Tāpēc, lai iegūtu nepieciešamo krēpu daudzumu (5 ml.), nepieciešams īsāks krēpu ierosināšanas laiks un hipertonskais sāls šķīdums (4% NaCl) iedarbojas īsāku laiku, kā arī, atšķaidoties ar gļotām, tas vājākā koncentrācijā iedarbojas uz bronhu epitēliju un mazāk to bojā. Treškārt, kā mēs novērojam, nesmēķētājiem pati krēpu ierosināšana izraisīja spēcīgu klepus lēkmi, kas bieži atkārtojās diezgan ilgajā krēpu ierosināšanā (līdz 30 min) un, iespējams, šā iemesla dēļ bronhu epitēlijs tika mehāniski bojāts. Tāpēc palielinājās tā izdalīšanās nesmēķētājiem, kas nav pieraduši pie tādām kairinošām vielām kā tabakas dūmi vai hipertonskais nātrija hlorīda šķīdums. Bez tam tieši nesmēķētāji sūdzējās par dedzinošu sajūtu bronhos pēc krēpu ierosināšanas.

### **1.3. Neitrofile leukocīti**

Mūsu pētījumā iegūtie dati norāda, ka gan relatīvais, gan absolūtais neitrofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem HOPS slimniekiem ir būtiski lielāks nekā veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem ar līdzīgu smēķēšanas anamnēzi, bet starp astmas slimnieku un veseliem cilvēkiem šāda atšķirība netika atklāta. Mūsu iegūtie rezultāti ir līdzīgi citu autoru datiem. Arī viņi norāda uz palielināto neitrofilo leukocītu absolūto un relatīvo skaitu ierosinātās krēpās HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem un veseliem smēķētājiem [26, 211, 263, 264, 378, 424, 425], kā arī salīdzinājumā ar astmas slimniekiem [26, 264, 310]. Atšķirībā no iepriekš minētajiem autoriem mēs nevis vienkārši salīdzinājām pacientu grupu aritmētiskos vidējos, bet ņēmām vērā katra pacienta smēķēšanas anamnēzi (mūžā izsmēķēto tabakas daudzumu pakgados) par kovarianti. Līdz ar to šī atšķirība vērojama pat nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem pacientiem. Mūsu iegūtie rezultāti ir līdzīgi citu autoru datiem. Arī viņi norāda, ka neitrofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās neatšķirās veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem [26, 264, 310, 469].

Turpretī segmentkodolaino neitrofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits venozajās asinīs nesmēķētājiem un smēķētājiem ar nelielu izsmēķēto pakgadu skaitu neatšķirās starp pacientu grupām.

Arī stabiņkodolaino neitrofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits venozajās asinīs būtiski neatšķīrās starp visām trim pētītajām grupām ar līdzīgu smēķēšanas anamnēzi.

Mūžā izsmēķētais tabakas daudzums visām trim pētītajām grupām (veseli cilvēku, HOPS, bronhiālās astmas slimnieki) ticami palielināja neitrofilo leukocītu relatīvo un absolūto skaitu ierosinātās krēpās, kā arī stabiņkodolaino leukocītu relatīvo un absolūto skaitu venozajās asinīs. Visstraujākais pieaugums bija neitrofilo leukocītu relatīvajam skaitam ierosinātās krēpās bronhiālās astmas slimnieku grupai. Tas bija straujāks nekā HOPS slimnieku grupai. Arī citi autori bija novērojuši palielinātu neitrofilo leukocītu relatīvo un absolūto skaitu ierosinātās krēpās [264] un BAL šķidrumā [339, 420, 497] veseliem smēķētājiem, salīdzinot ar veseliem nesmēķētājiem, bet atšķirībā no mums viņi salīdzināja divas diskretas grupas (smēķētāji un nesmēķētāji), bet mēs – neitrofilo leukocītu skaitu atkarībā no katra pacienta izsmēķēto pakģadu skaita, lai redzētu procesu dinamiku.

Neitrofilo leukocītu absolūtais skaits ierosinātās krēpās visām trim grupām mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē palielinājās vienādi. Vienīgi HOPS slimniekiem neitrofilo leukocītu skaits jau ar mazu smēķēšanas stāžu, kā arī pieaugot izsmēķēto pakģadu skaitam bija lielāks nekā veseliem cilvēku un astmas slimniekiem. Stabiņkodolaino leukocītu relatīvais un absolūtais skaits venozajās asinīs visām trim grupām pieauga vienādi mūžā izsmēķētās tabakas ietekmē.

Segmentkodolaino leukocītu relatīvais un absolūtais skaits venozajās asinīs HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupās ticami palielinājās mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē, turpretī veselo cilvēku grupā netika novērotas ticamas pārmaiņas. Segmentkodolaino leukocītu relatīvā skaita palielināšanās asinīs HOPS slimnieku grupai bija tāda pati kā astmas slimnieku grupai un ticami atšķīrās no veselo cilvēku grupas, bet absolūtā skaita palielināšanās visstraujākā bija HOPS slimnieku grupai, nedaudz lēnāka astmas slimnieku grupai, un ticama atšķirība tika novērota tikai starp HOPS slimnieku un veselo cilvēku grupu.

Smēķēšana veicina neitrofilo iekaisumu bronhos ne tikai HOPS, bet arī bronhiālās astmas slimniekiem un smēķētājiem, kam nav elpceļu obstrukcijas, par ko liecina neitrofilo leukocītu absolūtā un relatīvā skaita pieaugums ierosinātās krēpās visām trim grupām smēķēšanas rezultātā. Smēķēšana veicina arī leukopoēzi kaulu smadzenēs visām pacientu grupām, par ko liecina stabiņkodolaino leukocītu relatīvā un absolūtā skaita pieaugums venozajās asinīs smēķēšanas dēļ. Nesmēķējošiem HOPS

slimniekiem un HOPS slimniekiem ar mazu smēķēšanas stāžu atšķirībā no astmas slimniekiem un cilvēkiem bez elpceļu obstrukcijas ar līdzīgu smēķēšanas anamnēzi ir intensīvāks neitrofilais iekaisums bronhos, kurš turpina pastiprināties, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam. Par to liecina palielinātais neitrofilo leukocītu skaits HOPS slimnieku ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar abām pārējām grupām, kurš turpina palielināties, pieaugot pakgadu skaitam. Tā kā asinīs stabiņkodolaino leukocītu absolūtais un relatīvais skaits veseliem cilvēkiem, HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem neatšķiras un smēķēšanas dēļ pieaug vienādi, bet ierosinātās krēpās HOPS slimniekiem neitrofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits līdzīgas smēķēšanas anamnēzes gadījumā ir lielāks nekā abām pārējām grupām, jādoma, ka to nosaka aizkavēta neitrofilo leukocītu apoptoze HOPS slimnieku bronhos. Bez tam par labu šai hipotēzei runā arī tas, ka neitrofilo leukocītu absolūtais skaits ierosinātās krēpās, palielinoties izsmēķēto pakgadu skaitam, pieaug arvien ātrāk - eksponenciāli, kamēr stabiņkodolaino leukocītu skaits pieaug lineāri. Bez tam segmentkodolaino leukocītu absolūtais skaits asinīs arī pieaug lineāri un būtiski HOPS slimniekiem, astmas slimniekiem ir tikai pieauguma tendence, bet veseliem cilvēkiem vispār nemainās izsmēķēto pakgadu ietekmē. Arī Aošiba norāda uz kavētu apoptozi HOPS slimnieku neitrofilajiem leukocītiem [12-14].

#### **1.4. Makrofāgi un monocīti**

Mūsu pētījuma rezultāti norāda, ka relatīvais makrofāgu skaits ierosinātās krēpās nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem HOPS slimniekiem ir būtiski mazāks nekā veseliem cilvēkiem ar līdzīgu smēķēšanas anamnēzi, bet starp astmas slimniekiem un veseliem cilvēkiem, kā arī starp astmas un HOPS slimniekiem šāda atšķirība netika atklāta.

Mūsu iegūtie rezultāti ir līdzīgi citu autoru datiem. Arī viņi norāda uz mazināto makrofāgu relatīvo skaitu ierosinātās krēpās HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem un smēķētājiem [26, 310, 378], kā arī astmas slimniekiem [26, 310], bet atšķirībā no iepriekš minētiem autoriem mums, kaut arī novērota līdzīga tendence, šī atšķirība starp HOPS un astmas slimnieku grupām nebija ticama. Pie kam, atšķirībā no iepriekš minētajiem autoriem, mēs nevis vienkārši salīdzinājām pacientu grupu vidējos aritmētiskos, bet ņēmām vērā katra pacienta smēķēšanas anamnēzi (mūžā izsmēķēto tabakas daudzumu pakgados) par kovarianti.

Visām trim pacientu grupām, palielinoties mūžā izsmēķēto pakgadu skaitam, būtiski mazinājās makrofāgu relatīvais skaits ierosinātās krēpās, pie kam astmas slimnieku grupā šim kritumam bija tendence notikt visstraujāk.

Neviena grupā nenovērojām nekādu ticamu sakarību starp smēķēšanas anamnēzi un makrofāgu absolūto skaitu ierosinātās krēpās. Bez tam netika novērotas nekādas ticamas atšķirības starp veselu cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupu makrofāgu absolūtā skaita ierosinātās krēpās vidējiem aritmētiskajiem. Arī Luī neatrod ticamas atšķirības makrofāgu absolūtajā skaitā ierosinātās krēpās starp veselu cilvēku, HOPS un astmas slimnieku grupām [310].

Netika konstatēta arī ticama mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekme uz asins monocītu relatīvo un absolūto skaitu nevienā no veselo cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupām. Arī asins monocītu relatīvais skaits ticami neatšķirās starp veselo cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupām, turpretī asins monocītu absolūtais skaits HOPS slimnieku grupai bija būtiski lielāks nekā veselo cilvēku grupai.

Mazinātais makrofāgu relatīvais skaits ierosinātās krēpās nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar veselo cilvēku grupu ar līdzīgu smēķēšanas anamnēzi un makrofāgu relatīvā skaita mazināšanās visās trīs grupās, pieaugot nosmēķēto pakgadu skaitam, bet nemainoties makrofāgu absolūtajam skaitam ierosinātās krēpās, skaidrojams pamatā ar neitrofilo leukocītu relatīvā skaita pieaugumu ierosinātās krēpās. Pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam, neitrofilo leukocītu relatīvais skaits palielinās visās trīs grupās, bet HOPS slimniekiem jau ar mazu smēķēšanas stāžu tas ir lielāks. Bez tam tas, ka makrofāgu absolūtais skaits ierosinātās krēpās mūsu pētījumā neatšķirās starp pētītajām grupām un nemainījās smēķēšanas dēļ, kā to norāda arī citi autori [264, 266], skaidrojams ar to, ka ierosinātās krēpas raksturo vairāk procesus lielākos bronhos, turpretī BAL - alveolās un sīkajos elpceļos. BAL, kā norāda citi autori, ir būtiski palielināts makrofāgu absolūtais skaits HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem un smēķētājiem [318, 457], kā arī palielināts smēķējošiem astmas slimniekiem un veseliem smēķētājiem salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [266, 267, 318, 443]. Arī mūsu pētījumā palielinātais monocītu absolūtais skaits HOPS slimnieku asinīs liecina par to pastiprinātu leukoipoēzi kaulu smadzenēs kam seko migrācija uz elpceļiem un alveolām.

## 1.5. Eozinofilie leukocīti

Kā zināms no citu autoru pētījumiem, bronhiālai astmai raksturīgs palielināts eozinofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits asinīs [295, 393] un īpaši ierosinātās krēpās [156, 159, 167, 169, 183, 204, 263, 266, 295, 387, 393, 469], kā arī BAL un BW [159, 204, 266]. Arī mēs nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem bronhiālās astmas slimniekiem novērojām būtiski palielinātu eozinofilo leukocītu relatīvo un absolūto skaitu ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem cilvēku un HOPS slimniekiem ar līdzīgu smēķēšanas anamnēzi. Arī asinīs neatkarīgi no smēķēšanas anamnēzes astmas slimniekiem bija būtiski palielināts eozinofilo leukocītu relatīvais skaits salīdzinājumā ar veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupu, bet eozinofilo leukocītu absolūtais skaits salīdzinājumā ar veselu cilvēku grupu.

Veselu cilvēku un HOPS slimnieku grupās eozinofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits ierosinātās krēpās neatšķīrās un vienādi būtiski palielinājās mūžā izsmēķētās tabakas ietekmē. Pie tam eozinofilo leukocītu absolūtā skaita palielināšanās veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupā ir arvien straujāka, palielinoties izsmēķēto pakgadu skaitam, ko raksturo eksponenciālas regresijas vienādojums. Turpretī astmas slimnieku grupā jau sākumā palielinātais eozinofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits neuzrādīja ticamas pārmaiņas mūžā izsmēķētās tabakas daudzuma ietekmē. Citu autoru dati par eozinofilo iekaisumu HOPS slimnieku elpceļos ir samērā pretrunīgi. Vieni konstatē būtiski palielinātu eozinofilo leukocītu relatīvo un absolūto skaitu HOPS slimnieku ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem un smēķētājiem [26, 170, 211, 425], un ir pat pētījums, kur šis skaits HOPS slimniekiem neatšķiras no astmas slimniekiem [310, 516]. Arī smēķēt pārtraukušu HOPS slimnieku ierosinātās krēpās un BAL Ratdžers novērojis palielinātu eozinofilo leukocītu skaitu salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem, bet tie nebija aktivēti [424]. Turpretī citos pētījumos novērots tikai neliels nebūtisks eozinofilo leukocītu skaita palielinājums HOPS slimnieku ierosinātās krēpās salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem un smēķētājiem [263, 264, 511]. Šīs pretrunas, iespējams, ir tāpēc, ka iepriekš minētie autori neņēma vērā katra pacienta izsmēķētos pakgadus jo, kā redzams no mūsu pētījuma, tieši izsmēķēto pakgadu skaitam ir būtiska ietekme uz HOPS slimnieku un veselu cilvēku eozinofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās. Pēc aptuveni 39 izsmēķētiem pakgadiem visām pacientu grupām (veseli cilvēki, HOPS un astmas slimnieki) ir vienāds eozinofilo leukocītu

absolūtais skaits ierosinātās krēpās, turpretī 0 pakgadu gadījumā veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem tas ir krietni mazāks nekā astmas slimniekiem (sk. 13. att.).

Asins eozinofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits nevienā mūsu pētītajā grupā neuzrādīja ticamas pārmaiņas mūžā izsmēķēto pakgadu ietekmē. Eozinofilo leukocītu skaita palielināšanos ierosinātās krēpās, bet nemainīšanos asinīs smēķēšanas dēļ veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupā, iespējams, var skaidrot ar smēķēšanas izraisītu lokālu elpceļu iekaisumu, kas varbūt saistīts ar eozinofilo leukocītu apoptozes kavēšanu. Par to liecina arī HOPS slimnieku ierosinātās krēpās novērotā paaugstinātā TNF- $\alpha$  koncentrācija [264] un hroniska bronhīta slimnieku biopsiju bronhu epitēlijšūnās un zemgļotādā novērotā palielinātā GM-CSF ekspresija salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [515], kas novērojumos *in vitro* reducē gan neitrofilo gan eozinofilo leukocītu apoptozi [411, 440, 553]. Savukārt astmas slimniekiem, arī nesmēķējošiem, jau ir kavēta eozinofilo leukocītu apoptoze elpceļos, tāpēc turpmākā smēķēšana vairs neietekmē to skaitu krēpās, par ko liecina to palielinātais, bet smēķēšanas dēļ nemainīgais skaits ierosinātās krēpās. Bez tam astmas slimniekiem bronhu epitēlijšūnās un zemgļotādā ir lielāka GM-CSF ekspresija nekā veseliem nesmēķētājiem, kā arī smēķētājiem ar hroniska bronhītu [515].

Daži autori, iesaka HOPS dalīt divos patoloģiskos fenotipos: eozinofilā un neozinofilā HOPS. Eozinofilai HOPS raksturīgs eozinofilo leukocītu un tuklo šūnu iekaisums [46, 310], un tā sastopama arī nesmēķējošiem HOPS slimniekiem [46]. Tāpat kā bronhiālās astmas gadījumā iespējami divi patoloģiski fenotipi: eozinofilā un neozinofilā astma, kuras gadījumā eozinofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās un asinīs nav palielināts, bet ir palielināts neitrofilo leukocītu skaits [186, 233]. Mēs savā pētījumā neizdalījām eozinofilās HOPS un neozinofilās astmas grupu, jo būtu krietni (vismaz trīs reizes) jāpalielina pētījuma apjoms, lai varētu veikt adekvātu statistisko analīzi. Bez tam neozinofilā astma un eozinofilā HOPS sastopamas retāk [233] un būtu jāveic atsevišķs pētījums.

Kā redzams no iepriekš minētā, smēķēšana veicina eozinofilo iekaisumu elpceļos smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas un HOPS slimniekiem, pie kam, palielinoties smēķēšanas stāžam, šis process kļūst arvien straujāks, par ko liecina eozinofilo leukocītu relatīvā un absolūtā skaita pieaugums ierosinātās krēpās smēķēšanas dēļ abām grupām. Bronhiālās astmas slimniekiem vērojams eozinofilais iekaisums elpceļos un smēķēšana neizraisa turpmāku eozinofilā iekaisuma



pastiprināšanos. Par to liecina palielinātais un no smēķēšanas neatkarīgais relatīvais un absolūtais eozinofilo leukocītu skaits i ierosinātās krēpās. Bronhiālās astmas slimniekiem raksturīgs palielināts eozinofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits venozajās asinīs, bet smēķēšana neietekmē šos raksturlielumus nevienā veselo cilvēku, HOPS un astmas slimnieku grupā, kas norāda uz lokālu smēķēšanas izraisītu eozinofilo iekaisumu plaušu audos, kurš, iespējams, saistīts ar eozinofilo leukocītu apoptozes kavēšanu smēķēšanas dēļ.

## 1.6. Limfocīti

Mūsu pētījumā netika konstatēta ticama mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz limfocītu relatīvo un absolūto skaitu ierosinātās krēpās un absolūto skaitu venozajās asinīs nevienā - veselo cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupā. Limfocītu relatīvais un absolūtais skaits ierosinātās krēpās un absolūtais skaits asinīs starp šīm grupām būtiski neatšķīrās.

Savukārt limfocītu relatīvais skaits venozajās asinīs, lai arī nulles pakģadu gadījumā visām trim grupām būtiski neatšķīrās, tomēr, pieaugot izsmēķēto pakģadu skaitam, HOPS un astmas slimnieku grupā tas būtiski vienādi mazinājās, turpretī veselu cilvēku grupā nekādas ticamas pārmaiņas netika novērotas.

Arī citi autori nenovēro ticamu atšķirību limfocītu relatīvajā, kā arī absolūtajā skaitā starp veselu nesmēķētāju, veselu smēķētāju, HOPS un astmas slimnieku grupām [26, 182, 264, 310, 469, 516]. Luī gan norāda, ka smēķējošiem HOPS slimniekiem limfocītu relatīvais skaits krēpās bija mazāks nekā smēķēt pārtraukušiem HOPS slimniekiem [310]. Bez tam, kā atklājis Spanevello un Balzāno, arī limfocītu skaitīšanas datu atkārtojamība starp diviem ierosināto krēpu paraģiem ar vairāku dienu intervālu bija slikta, ko viņš galvenokārt skaidro ar šo šūnu reto sastopamību ierosinātās krēpās, kā arī ar grūtībām šo šūnu nekļūdīgā atpazīstamībā ierosinātās krēpās, ja nav veikta specifiskā antivielu saistītā krāsošana [26, 469]. Nemainīts limfocītu relatīvais un absolūtais skaits ierosinātās krēpās mūsu pētījumā acīmredzot ir tāpēc, ka mēs nelietojām imūncitoģīmiju, kas ļautu identificēt limfocītu subpopulācijas. Bez tam ierosinātās krēpas pārsvarā raksturo iekaisumu bronhu lūmenā, bet palielināts limfocītu skaits pārsvarā ir bronhu zemģlotādā, kur HOPS slimniekiem dominē CD8<sup>+</sup> Th1 limfocīti, kas ir galvenās infiltrētās šūnas zemģlotādā, bet bronhiālās astmas gadījumā CD3<sup>+</sup> un CD4<sup>+</sup> Th2 limfocīti [124, 316, 369, 419, 431, 545].

Mūsu pētījumā atklātā limfocītu relatīvā skaita mazināšanās asinīs HOPS un astmas slimnieku grupai izsmēķēto pakgadu ietekmē, nemainoties limfocītu absolūtajam skaitam, domājams, notiek uz segmentkodolaino neitrofilo leukocītu relatīvā un absolūtā skaita palielināšanās rēķina asinīs, kas vērojama šīm slimnieku grupām izsmēķēto pakgadu ietekmē.

## **1.7. Bazofīlie leukocīti**

Mūsu pētījumā netika novērota dzīvē izsmēķēto pakgadu skaita ticama ietekme uz tuklo šūnu un bazofīlo leukocītu relatīvo un absolūto skaitu ierosinātās krēpās un venozajās asinīs nevienā - veselo cilvēku, HOPS un bronhiālās astmas slimnieku grupā. Arī bazofīlo leukocītu absolūtais un relatīvais skaits ticami neatšķiras starp šīm grupām.

Citi autori astmas slimniekiem konstatējuši būtisku palielinātu metahromatisko šūnu (tuklo šūnu un bazofīlo leukocītu) skaitu ierosinātās un spontānās krēpās salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem [272, 371, 387, 390], kā arī smēķētājiem ar neobstruktīvu bronhītu, kuriem savukārt tas neatšķiras no veseliem nesmēķētājiem [182, 390]. Turpretī HOPS slimniekiem ar palielinātu eozinofiliju novērots paaugstināts triptāzes līmenis ierosinātās krēpās, kas liecina par pastiprinātu tuklo šūnu aktivitāti [310]. Tas, ka mēs nenovērojam tuklo šūnu un bazofīlo leukocītu skaita izmaiņas astmas slimniekiem, acīmredzot it tāpēc, ka iepriekš minētie autori veica papildu specifisku metahromatisku krāsošanu ar toluidīnzilo, pirms tam fiksējot paraugu ar Karnuā fiksatoru, turpretī mēs lietojām tikai Meja-Grīnvalda-Gīnzas krāsošanas metodi, kas nav tik specifiska bazofīliem leukocītu un tuklajām šūnām, tāpēc šīs šūnas ir grūtāk identificēt. Tā kā metahromatiskās šūnas ierosinātās krēpās reti sastopamas (astmas gadījumā 0,3 - 0,5%, veseliem cilvēkiem - 0,039 - 0,07% [387, 390]), precīzāku rezultātu iegūšanai parasti skaita 1500 neplakano šūnu no stikliņa, bet pārējo šūnu diferenciālskaitīšanai pietiek ar 400 neplakanām šūnām no stikliņa [182, 387, 390], kā tas bija arī mūsu pētījumā.

## **2. Bioķīmiskie raksturlielumi**

### **2.1. Glutaciona peroksidāze**

Ne veseliem cilvēkiem, ne bronhiālās astmas slimniekiem netika novērota ticama mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz GPx aktivitāti ierosinātās krēpās. Turpretī HOPS slimnieku grupā konstatēja sākumā būtiski palielinātu, bet pēc tam logaritmisku GPx aktivitātes mazināšanos mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma

ietekmē. Nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem HOPS slimniekiem šī GPx aktivitāte elpceļos bija būtiski lielāka nekā veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem ar līdzīgu smēķēšanas anamnēzi. Palielināto GPx aktivitāti nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem HOPS slimniekiem var skaidrot ar neitrofilo iekaisumu. Neitrofilā iekaisuma dēļ tiek pastiprināti izdalīti oksidanti [122] un iekaisuma mediatori, piemēram, TNF- $\alpha$ , kas savukārt aktivē glutaciona un GPx sintēzi elpceļu epitēlijšūnās [101, 408], alveolārajos makrofāgos un plaušu interstīcija šūnās [21]. Kā liecina mūsu pētījuma rezultāti un arī literatūras dati arī nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem HOPS slimniekiem ir palielināts neitrofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās, kurš turpina palielināties, pieaugot izsmēķēto pakģadu skaitam [26, 211, 263, 264, 378, 424, 425]. Šie neitrofilie leukocīti un arī makrofāgi ir aktivēti un pastiprināti izdala brīvos skābekļa un slāpekļa radikāļus [61, 199, 221, 235, 404, 405, 480], kas savukārt veicina pastiprinātu antioksidantu izdalīšanos no elpceļu epitēlijšūnām un citām šūnām [408]. Palielinoties smēķēšanas stāžam, pieaug neitrofilo leukocītu iekaisums un elpceļu epitēlija bojājumi, kas, iespējams, mazina šo šūnu antioksidatīvo fermentu producēšanas spēju, vai arī tabakas dūmos un iekaisuma dēļ palielinātais oksidantu daudzums straujāk degradē eGPx, tai intensīvāk iesaistoties redukcijas un oksidācijas reakcijās. Kā norāda Avisāra, pēc iedarbības ar ozonu būtiski kritās GPx aktivitāte un eGPx koncentrācija BAL epitēliju klājošajā šķidrumā. Viņa arī novēroja negatīvu korelāciju starp eGPx koncentrāciju un neitrofilo leukocītu skaitu BAL [22]. Savukārt Komhērs novērojis palielinātu eGPx mRNS sintēzi elpceļu epitēlijšūnās un alveolārajos makrofāgos smēķētājiem. Arī *in vitro* bronhu epitēlijšūnās pēc iedarbības ar brīvajiem radikāļiem ticami palielinās eGPx mRNS ekspresija [100]. Šo fenomenu drīzāk var skaidrot ar GPx inaktivāciju oksidantu ietekmē, par spīti tā pastiprinātai sintēzei elpceļu epitēlijšūnās, nekā ar pašas sinēzes mazināšanos epitēlijšūnās [22]. Bez tam neitrofilo leukocītu izdalītie un tabakas dūmos esošie oksidanti palielina antioksidatīvās aizsardzības sistēmas aktivitātes nepieciešamību. Pastiprinātā oksidantu izdalīšanās un tabakas dūmos esošās dzelzs uzkrāšanās elpceļos var ierosināt lipīdu peroksidācijas ķēdes reakciju [35, 209, 415, 498, 534], kas ir pašpastiprinošs process, tāpēc veidojas plašs lipīdu radikāļu spektrs [64]. Arī šo lipīdu radikāļu neitralizācijai nepieciešama pastiprināta antioksidatīvās sistēmas aktivitāte, kur GPx, iespējams ir galvenā nozīme lipīdu peroksīdu neitralizācijā [209]. Tāpēc dubultās oksidatīvās slodzes dēļ HOPS slimniekiem antioksidatīvās aizsardzības

sistēmas fermenti, piemēram, GPx iesaistās vairāk redukcijas un oksidācijas reakcijās un straujāk degradējas [22, 408] nekā veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem. Iespējams, tāpēc HOPS slimniekiem sākumā palielinātā GPx aktivitāte ierosinātās krēpās strauji mazinājās, pieaugot smēķēšanas stāžam. GPx aktivitāte elpceļu klājošajā šķidrumā bija nepietiekama, lai aizsargātu plaušu audus no oksidatīviem bojājumiem, un pastiprināja iekaisumu, kas savukārt palielināja oksidatīvo slodzi [408]. Elpceļu epitēlijšūnas un makrofāgi nespēj sintezēt tik daudz GPx, lai nodrošinātu tā pietiekamu aktivitāti epitēliju klājošajā šķidrumā. Par to netieši liecina mūsu novērotās GPx aktivitātes pārmaiņas HOPS slimnieku asins plazmā smēķēšanas ietekmē.

Asins plazmas GPx aktivitāte HOPS slimnieku grupā būtiski palielinājās, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam. Savukārt veselo cilvēku un astmas slimnieku grupā netika konstatēta ticama izsmēķēto pakgadu ietekme uz plazmas GPx aktivitāti. To var skaidrot ar ģeneralizētu organisma antioksidatīvās aizsardzības sistēmas atbildreakciju uz palielinātu oksidatīvo slodzi HOPS slimniekiem. Tā tomēr ir nepietiekama, lai aizsargātu plaušu audus no oksidatīvā stresa. Par galveno plazmas ekstracelulārās GPx avotu tiek uzskatītas nieru proksimālo kanāliņu šūnas [20]. Iespējams, arī plaušu audos pastiprināti sintezējas GPx [100, 408], bet, tā kā šie audi ir tiešā saskarē ar oksidantu avotiem, GPx straujāk degradējas un HOPS slimniekiem novērojām pretēju procesu - GPx aktivitātes krišanos. Pie tam tā HOPS slimnieku ierosinātās krēpās, pieaugot smēķēšanas stāžam, notiek vienlaikus ar mūsu konstatēto elpceļu epitēlija caurlaidības un plazmas transudācijas palielināšanos. Par to liecina urīnvielas relatīvās koncentrācijas krēpās pret koncentrāciju asinīs pieaugums smēķēšanas ietekmē (sk. 30. att. un 2.4. apakšnodaļu: "Urīnviela" Diskusijas daļā) un GPx aktivitātes palielināšanās plazmā, kur GPx aktivitāte ir vairākas reizes lielāka nekā krēpās. Arī Avisāra norāda uz GPx aktivitātes krišanos elpceļu klājošajā šķidrumā ozona ietekmē, par spīti palielinātai plazmas caurlaidībai ozona ietekmē un lielākai plazmas GPx aktivitātei nekā epitēliju klājošajā šķidrumā [22]. Lai arī Avisāra pētīja veselus nesmēķētājus, tomēr tāda spēcīga oksidanta inhalācija kā ozons, kas izraisa neitrofilo iekaisumu un oksidatīvo stresu [22], iespējams, var izmantot par modeli HOPS oksidatīvā stresa pētījumiem. Mūsu GPx aktivitātes pētījums HOPS slimnieku ierosinātās krēpās varbūt ir viens no pirmajiem, jo mums pieejamā literatūrā neizdevās atrast citus pētījumus, kur būtu noteikta GPx aktivitāte ierosinātās krēpās HOPS slimniekiem. Savukārt, salīdzinot GPx aktivitāti elpceļus klājošajā

šķidrumā no BAL veseliem smēķētājiem un nesmēķētājiem, arī citi autori nenovēroja būtiskas atšķirības [99]. Tas saskan ar mūsu datiem, kur izsmēķēto pakgadu skaits neietekmēja GPx aktivitāti ierosinātās krēpās veseliem cilvēkiem. Savukārt plazmā Komhērs novēroja būtiski lielāku GPx aktivitāti veseliem smēķētājiem, salīdzinot ar nesmēķētājiem, kaut arī paša eGPx proteīna koncentrācija starp šīm grupām neatšķīrās [99]. Tas atšķīrās no mūsu datiem, kur smēķēšanas anamnēze būtiski neietekmēja seruma GPx aktivitāti veseliem cilvēkiem. Tāpat kā mēs, arī Pikado nenovēroja ticamas atšķirības GPx aktivitātē plazmā [386]. Arī citi autori neatklāja ticamas atšķirības kopējā asins GPx aktivitātē starp astmas slimniekiem un veseliem cilvēkiem [335, 475], turpretī Filips novēroja pastiprinātu asins GPx aktivitāti astmas slimnieku grupā [162].

Vislabāk plazmas GPx aktivitāti bronhiālās astmas slimnieku grupā var aprakstīt, izmantojot trīsfaktoru eksponenciālās regresijas modeli, kur atkarīgais faktors (GPx aktivitāte) plazmā mainās atkarībā no neatkarīgajiem faktoriem: asins monocītu un limfocītu absolūtā skaita un to mijiedarbības. Astmas slimnieku grupā novēroja būtisku pozitīvu eksponenciālu asins monocītu un limfocītu absolūtā skaita ietekmi uz GPx aktivitāti plazmā. Savukārt asins monocītu un limfocītu skaita mijiedarbības ietekme uz GPx aktivitāti plazmā astmas slimnieku grupā bija negatīva. Asins monocītu ietekmes īpatsvars bija 16,5%, asins limfocītu - 20,6%, monocītu un limfocītu mijiedarbības - 16,1%. Kopējais modeļa faktoru ietekmes īpatsvars astmas slimnieku grupā bija 53,2%. Savukārt veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupā netika novērota ticama asins monocītu, limfocītu un to mijiedarbības ietekme uz GPx aktivitāti plazmā, tāpēc šo trīs faktoru ietekme astmas slimnieku grupā ticami atšķīrās no veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupām. GPx aktivitātes palielināšanos bronhiālās astmas slimnieku asins plazmā palielināta asins monocītu un limfocītu skaita gadījumā, kā arī šo šūnu mijiedarbību varbūt var skaidrot ar imūniekaisumā iesaistīto šūnu izdalīto mediatoru ietekmi uz oksidantus un/vai antioksidantus producējošām šūnām. Precīzāk šo procesu skaidrot ir grūti, jo netika noteiktas limfocītu subpopulācijas un to sintezētās signālmolekulas. Bez tam arī paši monocīti un limfocīti var izdalīt oksidantus [210, 509]. Aktivēti astmas slimnieku asins monocīti izdala vairāk ūdeņraža peroksīda un kopējo brīvo radikāļu nekā veselu cilvēku monocīti [509].

Apkopojot iepriekš minēto, var secināt, ka nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem HOPS slimniekiem ir pastiprināta GPx aktivitāte ierosinātās krēpās,

ko var skaidrot ar pastiprinātu GPx sintēzi bronhu epitēlijšūnās un citās šūnās, atbildot uz neitrofilo leukocītu iekaisuma izraisītu pastiprinātu oksidantu izdalīšanos no šīm šūnām un lipīdu peroksidācijas ķēdes reakcijās veidoto lipīdu hidroperoksīdu pastiprinātu veidošanos. Savukārt, pieaugot smēķēšanas stāžam, šī GPx aktivitāte HOPS slimnieku krēpās krītas. Šīs parādības cēlonis varētu būt pastiprināta GPx degradācija, tai pastiprināti iesaistoties oksidācijas un redukcijas reakcijās papildu oksidatīvās slodzes ietekmē, ko izraisa tabakas dūmos esošie oksidanti un arvien lielāks daudzums lipīdu peroksīdu. GPx aktivitātes mazināšanos varētu izraisīt arī palielinātie epitēlijšūnu un citu GPx producējošo šūnu bojājumi, kas, iespējams, mazina to spēju sintezēt GPx pastiprinātas oksidatīvās slodzes apstākļos. Plazmā novēro GPx aktivitātes pieaugumu HOPS slimniekiem, pieaugot smēķēšanas stāžam, ko var skaidrot ar ģeneralizētu organisma antioksidatīvās aizsardzības sistēmas atbildreakciju uz palielinātu oksidatīvo slodzi HOPS slimniekiem, kas tomēr ir nepietiekama, lai aizsargātu plaušu audus no oksidatīvā stresa. Savukārt bronhiālās astmas slimniekiem ir, pozitīva asins monocītu un limfocītu absolūtā skaita ietekmi uz plazmas GPx aktivitāti, bet monocītu un limfocītu mijiedarbības ietekme ir negatīva. To, iespējams, var skaidrot ar šo imūniekaisumā iesaistīto šūnu izdalīto mediatoru ietekmi uz oksidantus un/vai antioksidantus producējošām šūnām.

## 2.2. Katalāze

Tieša smēķēšanas ietekme uz katalāzes aktivitāti ierosināto krēpu supernatantā netika novērota nevienā pētītā grupā. Vislabāk HOPS slimnieku grupai CAT aktivitāti krēpu supernatantā var aprakstīt ar trīsfaktoru pakāpes regresijas modeli, kur CAT aktivitāte mainās atkarībā no neitrofilo leukocītu skaita krēpās, GPx aktivitātes krēpu supernatantā un krēpu supernatanta oksidējamības. Vislielākā būtiskā ietekme uz CAT aktivitāti HOPS slimnieku grupā bija neitrofiliem leukocītiem, kuru ietekmes īpatsvars bija 34,4%. Jo lielāks neitrofilu leukocītu skaits, jo lielāka CAT aktivitāte. Mazāka, bet būtiska ietekme uz CAT aktivitāti bija GPx aktivitātei, kas bija 16,0%. Jo lielāka GPx aktivitāte krēpu supernatantā, jo lielāka CAT aktivitāte. Savukārt vismazākā būtiskā ietekme uz CAT aktivitāti bija krēpu supernatanta oksidējamībai (11,8%). Arī šai gadījumā, jo lielāka substrāta oksidējamība, jo lielāka katalāzes aktivitāte.

Veselu cilvēku grupā ne GPx, ne substrāta oksidējamībai krēpu supernatantā nebija ticama ietekme uz CAT aktivitāti, kas būtiski atšķīrās no HOPS. Vienīgi

neitrofilo leukocītu skaitam ierosinātās krēpās bija būtiska ietekme uz krēpu supernatanta CAT aktivitāti (19,1%). Arī šai gadījumā, jo lielāks neitrofilo leukocītu skaits, jo lielāku katalāzes aktivitāte ierosinātās krēpās.

Savukārt astmas slimnieku grupā atšķirībā no abām pārējām grupām nenovēroja nekādu neitrofilo leukocītu skaita krēpās, GPx un substrāta oksidējamības krēpu supernatantā ietekmi uz CAT aktivitāti ierosināto krēpu supernatantā.

Savukārt diagnozes ietekme bija būtiska - ar kovariācijas analīzi izslēdzot neitrofilo leukocītu skaita, GPx aktivitātes un substrāta oksidējamības ietekmi uz CAT aktivitāti, HOPS slimniekiem CAT aktivitāte bija būtiski vājāka nekā veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem.

Vislabāk astmas slimnieku grupai CAT aktivitāti krēpu supernatantā var aprakstīt ar divfaktoru pakāpes regresijas modeli, kur CAT aktivitāte mainās atkarībā no eozinofilo leukocītu un limfocītu skaita ierosinātās krēpās. Vislielākā būtiskā ietekme uz CAT aktivitāti astmas slimnieku grupā bija eozinofiliem leukocītiem, kuru ietekmes īpatsvars bija 21,4%. Jo lielāks eozinofilo leukocītu skaits, jo lielāka CAT aktivitāte. Savukārt mazāka, pretēja, bet būtiska ietekme uz katalāzes aktivitāti astmas slimnieku grupā bija limfocītu skaitam ierosinātās krēpās - 14,3%. Lielāka limfocītu skaita gadījumā ierosinātās krēpās novēroja vājāku CAT aktivitāti krēpu supernatantā. Arī HOPS slimnieku grupā bija krēpu eozinofilo leukocītu skaita ietekmes tendenci uz CAT aktivitāti, kas bija 12,9%. Pieaugot eozinofilo leukocītu skaitam, palielinājās katalāzes aktivitāte. Turpretī netika novērota ticama limfocītu skaita ietekme uz CAT aktivitāti. Savukārt veselo cilvēku grupā netika konstatēta ticama eozinofilo leukocītu un limfocītu ietekme uz CAT aktivitāti ierosinātās krēpās.

Katalāzes aktivitātes pastiprināšanos, palielinoties krēpu neitrofilo un eozinofilo leukocītu skaitam, HOPS slimnieku grupā var skaidrot ar intensīvu oksidantu, arī ūdeņraža peroksīda, izdalīšanos no šīm šūnām [265, 381]. Daļu no tiem SOD pārvērš ūdeņraža peroksīdā, kas savukārt ir CAT substrāts [64, 78]. Bez tam ūdeņraža peroksīds, reaģējot ar hlora jonu, neitrofilo leukocītu MPO ietekmē var veidot hipohlorskābi, kas ir spēcīgs oksidants [35, 209, 218]. Arī veselo cilvēku grupā novēroja CAT aktivitātes palielināšanos, pieaugot neitrofilo leukocītu skaitam ierosinātās krēpās, bet mazāk izteiktu nekā HOPS slimnieku grupā, turpretī nebija ticama saistība ar eozinofilo leukocītu skaitu krēpās. To var skaidrot ar iespējami vājāku neitrofilo un īpaši eozinofilo leukocītu aktivitāti veselo cilvēku grupā, jo smēķēšanas dēļ gan veseliem cilvēkiem, gan HOPS slimniekiem eozinofilo leukocītu

skaits pieaug vienādi. Lai gan smēķēšanas dēļ arī veseliem cilvēkiem pieaug neitrofilo leukocītu oksidatīvā aktivitāte [61, 311], bet, iespējams, mazāk nekā HOPS gadījumā. Tas arī var būt saistīts ar vājāku CAT aktivitāti HOPS slimniekiem, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem, ja matemātiski izslēgta pārējo faktoru (neitrofilo leukocītu, GPx un substrāta oksidējamības) ietekme. Tādējādi HOPS slimniekiem CAT aktivitāte šo trīs faktoru ietekmē palielinās no sākotnēji zemāka līmeņa. Savukārt astmas slimnieku grupā galvenais CAT aktivitāti palielinošais faktors bija eozinofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās, kuram bija daudz lielāka ietekme uz CAT aktivitāti nekā HOPS slimnieku grupā. To var skaidrot ar eozinofilā iekaisuma dominēšanu astmas slimniekiem. Kā zināms, aktivēti eozinofīlie leukocīti var izdalīt pat vairāk oksidantu nekā neitrofilie leukocīti [314, 447, 554]. Turpretī, limfocītu skaitam palielinoties, CAT aktivitātes mazināšanos astmas slimnieku grupai acīmredzot var skaidrot ar limfocītu izraisītu eozinofilo leukocītu oksidatīvās aktivitātes mazināšanos vai CAT producēšanas mazināšanos no to producējošām šūnām limfocītu izdalīto mediatoru ietekmē. CAT aktivitātes pastiprināšanos, palielinoties GPx aktivitātei krēpu supernatantā, novēroja tikai HOPS slimnieku grupā. Kā zināms, katalāze, līdzīgi kā glutaciona red ukcijas un oksidācijas sistēma izmanto vienu un to pašu substrātu - ūdeņraža peroksīdu, to padarot neaktīvu, pārvēršot par ūdeni. Acīmredzot abiem šiem fermentiem ir kopēja redukcijas un oksidācijas atkarīga gēnu ekspresijas regulācija. Par to liecina arī citu autoru novērotās CAT un GPx aktivitātes un ekspresijas līdzīgās pārmaiņas, kas ir pretējas SOD aktivitātes un ekspresijas pārmaiņām [101, 162, 495]. Tomēr atšķirībā no katalāzes, glutaciona redukcijas un oksidācijas sistēma ir spējīga inaktivēt arī lipīdu hidroperoksīdus, tos reducējot [208, 209]. Smēķēšanas stāžam pieaugot, iespējams, papildu oksidatīvās slodzes dēļ, iesaistoties redukcijas un oksidācijas reakcijās ar lipīdu peroksīdiem, par spīti GPx, pastiprinātai izdalīšanai asins plazmā, GPx aktivitāte krēpās mazinās. Turpretī CAT nepiedalās lipīdu peroksīdu inaktivācijā. Tāpēc atšķirībā no GPx, kuras aktivitāte krēpās mazinājās, CAT aktivitāte palielinājās, atbildot uz neitrofilo un eozinofilo leukocītu vai citu fermentu veidotā ūdeņraža peroksīda pieaugumu krēpās. Kā zināms, SOD inaktivē daudz aktīvākus brīvos radikāļus, piemēram, superoksīda anjonu, to pārvēršot mazāk aktīvajā ūdeņraža peroksīdā, kas savukārt ir CAT un GPx substrāts [64]. CAT aktivitātes pastiprināšanos, palielinoties substrāta oksidējamībai, HOPS slimnieku grupā var skaidrot ar kompensatorisku mehānismu kā atbildreakciju uz kopēju antioksidatīvās



aizsardzības sistēmas vājināšanos krēpu supernatantā. Substrāta oksidējamība raksturo kopējo antioksidatīvās sistēmas aktivitāti (gan enzimatisko, gan neenzimatisko). Jo lielāka substrāta oksidējamība, jo vājāka kopējā antioksidatīvā aizsardzība. Tieši HOPS slimnieku grupā tā bija visvājākā (sk. 2.3. apakšnodaļu “Substrāta oksidējamība” Diskusijas nodaļā). Vājinātā kopējā antioksidatīvā aizsardzība, par spīti CAT aktivitātes pieaugumam, iespējams, saistīta ar kāda mūsu pētījumā neiekļauta antioksidanta deficītu HOPS slimnieku grupā. Tā varētu būt kāda SOD vai arī kāds neenzimatisks antioksidants. Piemēram, citi autori norāda uz vājinātu SOD aktivitāti smēķētājiem salīdzinājumā ar nesmēķētājiem un astmas slimniekiem BAL [99, 133], kas HOPS slimniekiem varbūt ir vēl vājāka.

Varam secināt, ka gan veseliem cilvēkiem, gan īpaši HOPS slimniekiem katalāzes aktivitāte palielinās, pieaugot smēķēšanas izraisītam neitrofilam iekaisumam, ko rada neitrofilo leukocītu izdalītie oksidanti. HOPS slimniekiem visstiprāko katalāzes aktivitātes palielināšanos, pieaugot neitrofilo leukocītu skaitam, var skaidrot ar vājāku katalāzes aktivitāti HOPS slimniekiem nekā veseliem cilvēkiem un astmas slimniekiem, ja izslēgta pārējo faktoru (neitrofilo leukocītu, GPx un substrāta oksidējamības) ietekme. Bronhiālās astmas slimniekiem katalāzes aktivitāte pieaug, palielinoties eozinofilo leukocītu izraisītajam iekaisumam plaušās, kas ir atbildreakcija uz šo šūnu izdalītajiem oksidantiem. Limfocītu skaita palielināšanās krēpās savukārt mazina katalāzes aktivitāti. Varbūt vainīga ir to kavējošā ietekme uz oksidantu izdalīšanos no eozinofiliem leukocītiem, vai katalāzi producējošām šūnām. Arī HOPS slimniekiem vērojama krēpu eozinofilo leukocītu skaita ietekme uz katalāzes aktivitāti, bet tā ir mazāk izteikta nekā astmas slimniekiem, jo eozinofīlā iekaisuma komponente HOPS slimnieku elpceļos ir mazāk spilgta. Bez tam HOPS slimniekiem CAT aktivitātes palielināšanās saistība ar GPx aktivitātes palielināšanos elpceļos, iespējams, saistīta ar līdzīga substrāta izmantošanu šiem abiem fermentiem, kā arī ar savstarpēji saistītu to sintēzes oksidantatkarīgu regulāciju. Katalāzes aktivitāte HOPS slimnieku elpceļos atkarīga no kopējās antioksidatīvās aizsardzības sistēmas aktivitātes. Jo vājāka kopējā antioksidatīvā aizsardzība, jo lielāka CAT aktivitāte. To var skaidrot ar vājinātu kāda cita mūsu pētījumā neiekļauta antioksidanta aktivitāti.

Tā kā mums neizdevās atrast citu autoru rakstus par katalāzes aktivitāti ierosināto krēpu supernatantā, mūsu darbs, iespējams, ir pirmais ekstracelulāras

katalāzes aktivitātes pētījums ierosinātās krēpās HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem.

### 2.3. Substrāta oksidējamība

HOPS slimnieku ierosināto krēpu supernatantā bija tendence palielinātai substrāta oksidējamībai salīdzinājumā ar veselīgiem cilvēkiem. Arī astmas slimniekiem novēroja nedaudz (nebūtiski) palielinātu substrāta oksidējamību. Tomēr tiešu saistību ar smēķēšanu, neitrofilo leukocītu vai citu šūnu skaitu nenovēroja. Toties tika atklāta būtiska pozitīva krēpu substrāta oksidējamības ietekme uz CAT aktivitāti krēpu supernatantā HOPS slimniekiem, kas norāda uz CAT aktivitātes pieaugumu, kā atbildreakciju uz pastiprināto oksidatīvo stresu HOPS slimniekiem (sk. 2.2. apakšnodaļu "Katalāze" Diskusijas nodaļā). Savukārt plazmas substrāta oksidējamībai nebija ticama atšķirība starp pētītajām grupām, kā arī citu mūsu pētīto faktoru ietekme uz to.

Palielināto substrāta oksidējamību HOPS slimnieku krēpu supernatantā, bet nemainīto substrāta oksidējamību plazmā var skaidrot ar lokālu oksidantu iedarbību plaušu audos, kur kopējā antioksidantu aktivitāte HOPS slimniekiem ir vājināta un nepietiekama, lai tos aizsargātu pret paaugstināto oksidatīvo stresu, turpretī plazmā kopējā antioksidatīvā aizsardzība ir pietiekama. Nedaudz nebūtiski palielināto substrāta oksidējamību astmas slimniekiem arī var skaidrot ar nedaudz vājināto antioksidatīvo aizsardzību, bet šī samazināšanās ir vājāk izteikta, nekā HOPS slimniekiem. Vājināto kopējo antioksidatīvo aizsardzību HOPS slimnieku grupā, iespējams var skaidrot ar palielinātā oksidantu daudzuma [122] izraisītu pastiprinātu antioksidantu iesaistīšanos oksidācijas un redukcijas reakcijās, tāpēc tie straujāk degradējas [22, 408], un pat pie pastiprināta antioksidantu (CAT, iespējams GPx uc.) izdalīšanās no elpceļu epiteliocītiem un citām šūnām, šī antioksidatīvā aizsardzība izrādās nepietiekama. Arī citi autori norāda uz pastiprinātu oksidantu izdalīšanos [122, 261, 373], palielinātu oksidācijas produktu izdalīšanos no HOPS slimnieku elpceļiem un vājinātu kopējo antioksidatīvo aizsardzību HOPS slimnieku plaušās [373]. Bez tam, iespējams, ka vājinātā antioksidatīvā aizsardzība ir tādām, diemžēl mūsu pētījumā neiekļautam, fermentem kā SOD vai arī neenzimātiskajiem antioksidantiem, kurus mēs nenoteicām. Tas, ka mums neizdevās atrast ticamu saistību starp substrāta oksidējamību krēpās un smēķēšanu, neitrofilo leukocītu skaitu un citām oksidantus producējošām šūnām, kā arī pati atšķirība substrāta oksidējamībai

starp HOPS slimnieku un veselo cilvēku grupu bija tikai tendence ( $p=0,0537$ ), skaidrojams ar pašu substrāta oksidējamību kā ļoti vispārīgu raksturlielumu, kas atkarīgs no visa antioksidantu (gan ezimātisko, gan neenzimātisko) kopuma, kā arī no oksidējamā substrāta daudzuma un īpašībām. Bez tam arī oksidantu avotu, kas varētu, pastiprināti izdalot oksidantus, degradēt dažādos antioksidantus, kā arī aktivēt to sintēzi, ir samērā daudz. Lai visus tos iekļautu daudzfaktoru kovariācijas vai regresijas analīzē, nepieciešams krietni palielināt paraugkopas apjomu.

Varam secināt, ka HOPS slimniekiem ir tendence uz vājinātu kopējo antioksidatīvo aizsardzību ierosinātās krēpās, bet nav vājināta kopējā antioksidatīvā aizsardzība asins plazmā, kas norāda uz lokālu pastiprinātas oksidatīvās slodzes izraisītu kopēju antioksidantu aktivitātes mazināšanos plaušās HOPS slimniekiem.

## 2.4. Urīnviela

Mēs elpceļu epitēlija un elpceļu asinsvadu endotēlija caurlaidības raksturošanai izmantojām samērā maz pētītu raksturlielumu urīnvielas koncentrāciju ierosināto krēpu supernatantā. Tā kā urīnviela neveidojas plaušu audos, bet tiek atnesta ar asinīm no aknām, bet asinīs tās koncentrācija katram indivīdam var variēt atkarībā no dažādiem faktoriem, mēs noteicām arī urīnvielas koncentrāciju asins plazmā. Pēc tam urīnvielas koncentrācija ierosinātās krēpās tika izteikta kā urīnvielas relatīva koncentrācija krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā.

Mūsu pētījumā gan veseliem cilvēkiem, gan HOPS slimniekiem mūžā izsmēķēto pakgadu skaits vienādi ātri un būtiski palielināja urīnvielas relatīvo koncentrāciju krēpās. Bez tam HOPS slimniekiem jau ar mazu smēķēšanas stāžu, kā arī pieaugot nosmēķēto pakgadu skaitam, urīnvielas relatīvajai koncentrācijai krēpās bija tendence būt augstākā līmenī nekā veselo cilvēku grupā. Turpretī bronhiālās astmas slimniekiem netika novērota ticama mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma ietekme uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju krēpās. Nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem astmas slimniekiem urīnvielas relatīvā koncentrācija krēpās bija būtiski augstāka nekā veselu cilvēku grupai, bet neatšķīrās no HOPS slimniekiem, kam arī bija tendence būt paaugstinātākai urīnvielas relatīvajai koncentrācijai nekā veseliem cilvēkiem ar līdzīgu smēķēšanas stāžu.

Palielināto urīnvielas relatīvo koncentrāciju krēpās nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem astmas un HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem cilvēkiem ar līdzīgu smēķēšanas stāžu var skaidrot ar iekaisuma izraisītu, visticamāk, elpceļu

epitēlija caurlaidības palielināšanos tā bojājuma dēļ. Arī citi autori norāda, ka urīnvielas ieplūšana BAL šķidrumā saistīta ar elpceļu epitēlija caurlaidības palielināšanos tā bojājuma dēļ [22, 357, 445]. Bez tam cigarešu dūmu ietekmē, pieaugot smēķēšanas stāžam, šī caurlaidība palielinās vienādi strauji gan HOPS slimniekiem, gan veseliem cilvēkiem, kaut arī veseliem cilvēkiem no sākotnēji zemāka līmeņa. Tas norāda, ka arī veseliem cilvēkiem smēķēšanas dēļ palielinās epitēlija caurlaidība. Arī Avisārs BAL pētījumos norāda uz urīnvielas caurlaidības palielināšanos veselu cilvēku elpceļu epitēlija pēc iedarbības ar tādu oksidantu kā ozons [22]. Turpretī astmas slimniekiem palielinātā epitēlija caurlaidība nemainās no smēķēšanas anamnēzes, kas ir samērā grūti skaidrojama. Uz elpceļu epitēlija un endotēlija caurlaidības palielināšanos tabakas dūmu ietekmē norāda albumīna palielināta koncentrācija smēķētāju ierosinātās krēpās un BAL [339, 516], kā arī mazinātais tehnēcija ( $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA) pusizskalošanās periods smēķētājiem [339]. Arī pētījumos *in vitro* novērota būtiska bronhu epitēlija kultūras caurlaidības palielināšanās pēc iedarbības ar tabakas dūmiem. Pie kam vislielākā tā ir kultūrās, kas iegūtas no HOPS slimniekiem, vidēja - no veseliem nesmēķētājiem, bet vismazākā - no veseliem smēķētājiem [423]. Tomēr ir arī pretēji vērojumi. Piemēram, Šmekele nekonstatē ticamu atšķirību urīnvielas koncentrācijā BAL un urīnvielas BAL/plazma attiecībā starp veselu nesmēķētāju un smēķētāju grupām [445]. Acīmredzot atšķirībā no mūsu pētījuma smēķēšanas anamnēze netika ņemta vērā kā kovariante, bez tam BAL gadījumā iespējama lielāka atšķaidījumu variācija, tāpēc iespējama lielāka datu izkliede. Kā novērojis Vords, izmantojot gan bioķīmisko, gan radioaktīvi iezīmētās urīnvielas noteikšanas metodi, veseliem smēķētājiem 10 min pēc smēķēšanas bija zemāka urīnvielas koncentrācija BAL nekā veseliem nesmēķētājiem [527]. Šai gadījumā atšķirībā no mūsu pētījuma, tomēr ir runa par akūtu tabakas dūmu ietekmi tūlīt pēc smēķēšanas. Tomēr skaidrot urīnvielas relatīvās koncentrācijas pārmaiņas tikai atkarībā no smēķēšanas un diagnozes būtu nekorekti, jo urīnvielas koncentrācijas atšķirību starp asinīm un ierosinātām krēpām var ietekmēt vairāki faktori, ne tikai endotēlija un epitēlija caurlaidība, kas līdz ar to ir ļoti komplicēts process.

Viens no tādiem faktoriem varētu būt krēpu ierosināšanas laiks - cik ilgi tika inhalēts hipertonskais nātrija hlorīda 4% šķidrums. Mūsu pētījumā, lai iegūtu nepieciešamo krēpu daudzumu (aptuveni 5 ml), katram cilvēkam bija atšķirīgs ierosināšanas laiks (3 - 30 min) un veselo cilvēku grupā līdz pat 37 min. Kaut arī tikai nedaudz hipertonskā sāls šķīduma, ko izsmidzina ultraskaņas inhalators (ražība 2,5

ml/min), paliek plaušās, iespējama krēpu un arī tur esošās urīnvielas atšķaidīšanās ar šo šķīdumu. Kā zināms no mūsu iepriekšējiem pētījumiem, kas veikti, izmantojot sprauslas inhalatorus, šī daļa variē atkarībā no inhalatora modeļa un cilvēka individualitātes. Piemēram, lietojot Pari-provo II inhalatoru un izmantojot brīvās elpošanas sistēmu, tikai 6,4% izsmidzinātā šķidrums paliek plaušās [483]. Ar mūsu izmantoto ultraskaņas inhalatoru mēs nenoteicām izsmidzinātā aerosola sadalījumu starp pacienta augšējiem elpceļiem, plaušām, izelpu un inhalatora vārstu sistēmā palikušo daļu, kā ar sprauslas inhalatoru. Tomēr, kā zināms, ultraskaņas inhalatoriem ir daudz augstāka izsmidzināto daļiņu dispersijas pakāpe un tāpēc lielāka aerosola daļa tiek izelpota un mazāka daļa var palikt plaušās. Bez tam ir vēl otrs faktors, kas var ietekmēt urīnvielas atšķaidījumu. Tā kā krēpu ierosināšanai tiek lietots hipertonsisks sāls šķīdums, osmozes ietekmē no bronhu epitēlijšūnām, interstīcija un asinīm var difundēt ūdens, atšķaidot krēpās esošo urīnvielu. Tomēr arī urīnviela var difundēt no asinīm un interstīcija, kaut arī, iespējams, lēnāk, jo lielāka molekulmasa. Efross žurku plaušas perfuzēja ar radioaktīvi iezīmēta ūdens ( $^3\text{HOH}$ ) un urīnvielas ( $^{14}\text{C}$ -urīnviela) maisījumu un atklāja, ka urīnvielas pārvietošanās no asinsrites uz elpceļiem ir būtiski lēnāka nekā ūdenim [146]. Tomēr, kā viņš norāda, urīnvielas ( $^{14}\text{C}$ -urīnviela) daudz lēnāko koncentrācijas palielināšanos savāktajā elpceļu šķīdumā salīdzinājumā ar ūdens ( $^3\text{HOH}$ ) koncentrācijas pieaugumu nevar skaidrot tikai ar brīvas difūzijas ātruma atšķirību, ar kādu šīs vielas difundē šķīdumā [146]. Relatīvais ātrums, ar kādu molekulas līdz 100 D molekulmasas difundē ūdensvidē, ir proporcionāls kvadrātsaknei no to molekulmasas [461]. No tā izriet, ka  $^3\text{HOH}$  (20 D) difundē tikai par 70% ātrāk nekā  $^{14}\text{C}$ -urīnviela (62D), turpretī pētījumā  $^3\text{HOH}$  koncentrācija elpceļos bija par divām kārtām lielāka nekā  $^{14}\text{C}$ -urīnvielai [146]. Tas norāda uz daļēji selektīvu difūziju (daļēju osmozi) attiecībā uz urīnvielau - daļēji caurlaidīga barjera urīnvielai [146, 412, 445]. Šī difūzija savukārt varētu būt saistīta ar endotēlija un epitēlija caurlaidību. Kā norāda Efross, pēc 2 min perfūzijas  $^{14}\text{C}$ -urīnvielas koncentrācija žurku elpceļos ir mazāka par 2% perfuzāta koncentrācijas, bet plaušu interstīcijā un šūnās  $^{14}\text{C}$ -urīnvielas koncentrācija šai laikā jau līdzsvarā koncentrācijai perfuzātā [146]. Tāpēc var secināt, ka elpceļu epitēlijs, kā arī tā šūnu membrāna ir slikti caurlaidīga urīnvielai salīdzinājumā ar endotēliju un citu plaušu šūnu membrānām [110, 146, 488]. Savukārt eksperimenti ar tiourīnvielu (urīnvielas transportproteīnu blokatoru), norāda, ka šīs endotēlija un epitēlija caurlaidības

atšķirības nav saistītas ar specifisko urīnvielas pārnesi, jo šī pārnese netika novērota plaušu audos vispār [146].

Mūsu pētījumā gan veseliem cilvēkiem, gan bronhiālās astmas slimniekiem, palielinoties krēpu ierosinātas laikam, būtiski mazinājās urīnvielas relatīvā koncentrācija ierosinātās krēpās. Savukārt HOPS slimnieku grupā netika novērotas ticamas pārmaiņas urīnvielas relatīvajā koncentrācijā ierosinātās krēpās atkarībā no krēpu ierosināšanas laika. Īslaicīgas krēpu ierosināšanas gadījumā netika novērota urīnvielas relatīvās koncentrācijas atšķirība starp pētītajām grupām. Turpretī, palielinoties krēpu ierosināšanas laikam, tam bija būtiski atšķirīga ietekme uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju. Ja veselo cilvēku un astmas slimnieku grupā urīnvielas relatīvā koncentrācija mazinājās, tad HOPS slimnieku grupā būtiski nemainījās atkarībā no ierosināšanas laika.

Urīnvielas relatīvās koncentrācijas nemainīšanos HOPS slimniekiem, palielinoties krēpu ierosināšanas laikam, vairāk atšķaidoties epitēliju klājošajam šķidrumam ar inhalēto hipertonuso šķidrumu un, iespējams, tā paaugstinātās osmolaritātes dēļ iesūkto ūdeni no apkārtējiem audiem, var skaidrot ar palielinātu elpceļu epitēlija urīnvielas caurlaidību. Kā iepriekš minēts, galvenā urīnvielas difūziju ierobežojošā barjera plaušās ir elpceļu epitēlijs. Palielinātu epitēlija caurlaidību var skaidrot ar nolobītu elpceļu epitēliju, spraugu atvēršanās starp epitēlijšūnām, bojātām vai pārveidotām epitēlijšūnām, kuru membrāna kļuvusi caurlaidīgāka urīnvielai, kā arī, iespējams, aktīvāku gļotu dziedzeru darbību un urīnvielas caurlaidības palielināšanos šajos dziedzeros. Tāpat kā HOPS slimniekiem mūsu pētījumā, arī cistiskās fibrozes slimniekiem citi autori nenovēroja ticamas pārmaiņas urīnvielas koncentrācijā krēpās 20 min ierosināšanas laikā [6]. Acīmredzot to noteica iekaisuma dēļ palielinātā elpceļu epitēlija caurlaidība urīnvielai. Savukārt veselo cilvēku un astmas slimnieku grupās novēroto urīnvielas relatīvās koncentrācijas mazināšanos, pieaugot krēpu ierosināšanas laikam, var skaidrot ar epitēliju klājošā šķidruma atšķaidīšanos ar inhalēto šķidrumu un papildus iesūkto šķidrumu no plaušu audiem, kur urīnvielas difūzija ir daļēji apgrūtināta. Ja veselo cilvēku grupā to varētu skaidrot ar nebojātu elpceļu epitēliju, tad bronhiālās astmas gadījumā, kā zināms, ir bojāts elpceļu epitēlijs [80, 287, 367]. Tāpēc astmas slimniekiem atšķirībā no mūsu novērotās urīnvielas relatīvās koncentrācijas mazināšanās, tāpat kā HOPS gadījumā, nevajadzētu mainīties urīnvielas relatīvajai koncentrācijai, pieaugot krēpu ierosināšanas laikam. Šo paradoksu, iespējams, var skaidrot ar elpceļu bazālās

membrānas sabiezēšanu, kas atšķirībā no HOPS vairāk raksturīga tieši bronhiālās astmas gadījumā [92, 111, 142, 284, 367]. Iespējams, tieši šī sabiezinātā bazālā membrāna astmas gadījumā ir galvenais urīnvielas difūziju ierobežojošais faktors.

Varam secināt, ka HOPS slimniekiem ir palielināta elpceļu epitēlija caurlaidība un smēķēšanas dēļ, pieaugot pakgadu skaitam, šī caurlaidība vēl vairāk pieaug. Bronhiālās astmas slimniekiem arī bronhu epitēlija caurlaidība, iespējams, ir palielināta, tomēr urīnvielas difūziju stipri ierobežo kāds cits faktors – iespējams, sabiezinātā elpceļu bazālā membrāna, par ko bez iepriekš minētās urīnvielas relatīvās koncentrācijas mazināšanās, pieaugot krēpu ierosināšanas laikam, par spīti astmai raksturīgajam bronhu epitēlija bojājumam, liecina arī urīnvielas relatīvās koncentrācijas nemainīšanās, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam. Visticamāk, cigarešu dūmi, tāpat kā veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem arī astmas slimniekiem palielina bronhu epitēlija caurlaidību, bet šo ietekmi nevar novērot sabiezētās bazālās membrānas dēļ, kura astmas gadījumā ir galvenais urīnvielas difūziju ierobežojošais faktors. Savukārt veselu cilvēku grupā elpceļu epitēlija caurlaidība ir mazāka nekā HOPS slimnieku grupā, tonēr tā palielinās, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam. Tomēr veselo cilvēku grupā atšķirībā no astmas un HOPS slimnieku grupām šī datu interpretācija ir sarežģītāka, nekā sākumā var šķist. Veselu cilvēku grupā urīnvielas relatīvo koncentrāciju, kā redzējam iepriekš, būtiski ietekmē abi faktori - gan smēķēšanas anamnēze, gan krēpu ierosināšanas laiks. Savukārt izsmēķēto pakgadu skaitam, kaut arī nebūtiski, ir tendence ietekmēt krēpu ierosināšanas laiku ( $p=0,103$ ). Proti, jo vairāk pakgadu izsmēķēts, jo mazāks nepieciešamais krēpu ierosināšanas laiks. Šā iemesla dēļ veicām divas atsevišķas iepriekš aplūkotās regresijas analīzes – urīnvielas relatīvā koncentrācija atkarībā no smēķēšanas anamnēzes un urīnvielas relatīvā koncentrācija atkarībā no krēpu ierosināšanas laika, nevis vienu apvienotu analīzi ar abiem šiem ietekmējošiem faktoriem, jo starp neatkarīgiem (ietekmējošiem) faktoriem nedrīkst būt savstarpēja korelācija. Tomēr, ja šos abus faktoros iekļauj modelī, optimālais variants ir, ja tajā iekļauj gan krēpu ierosināšanas laiku, gan smēķēšanas un krēpu ierosināšanas laika mijiedarbību. Aprēķinot egūst, ka gan krēpu ierosināšanas laika ietekme ir būtiska ( $p=0,023$ ), gan smēķēšanas un krēpu ierosināšanas laika mijiedarbībai ir ietekmes tendence uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju ( $p=0,099$ ). Tāpēc var apgalvot, ka veseliem cilvēkiem elpceļu epitēlija caurlaidība ir mazāka nekā HOPS un, iespējams, arī astmas slimniekiem. Smēķēšanas dēļ šī caurlaidība palielinās, bet daļa konstatētās

caurlaidības palielināšanās, iespējams, ir uz mazāka nepieciešamā krēpu ierosināšanas laika rēķina (urīnviela mazāk atšķaidās) veseliem smēķētājiem ar lielu smēķēšanas stāžu.

Vairums autoru pieņem, ka pirms BAL vai krēpu ierosināšanas urīnvielas koncentrācija epitēliju klājošā šķidrumā elpceļos ir vienāda vai tuva urīnvielas koncentrācijai asins plazmā [146, 357, 412, 445]. Tomēr, kā esam konstatējuši, visas regresijas līknes tuvu nulles minūšu ilgas ierosināšanas gadījumā sākas nevis no 100% urīnvielas relatīvās koncentrācijas, bet no 43,39 līdz 45,54% (sk. 33. att., līknes pie abscisas sākumpunkta, kā arī vienādojumu brīvie locekļi -  $b_0$  koeficienti). Bez tam nevienam cilvēkam, arī ļoti maza ierosināšanas laika gadījumā, nenovēroja krēpu urīnvielas relatīvo koncentrāciju, kas būtu augstāka par 80% koncentrācijas plazmā (sk. 33. att., punkti). Tas norāda, ka urīnvielas koncentrācija, lai arī kāda būtu bronhu epitēlija caurlaidība, nekad pilnībā nepagūst līdzsvaroties starp asins plazmu un krēpām. Iemesls varētu būt bronhociliārā pārnese un spontāno krēpu izdalīšanās, kas visu laiku aizvāc izveidojušās krēpas kopā ar tur esošo urīnvielu. Tomēr ir arī pretējs process - no alveolu un perifērisko elpceļu virsmas pastāvīgi iztvaiko ūdens, kas izdalās ar izelpas gaisu, un šim procesam ir tendence palielināt sāļu un, iespējams, arī urīnvielas koncentrāciju epitēliju klājošā šķidrumā. Tomēr arī urīnviela izdalās ar izelpas gaisu aerosola veidā, kurš veidojas elpošanas procesā plaušās. Par to liecina arī urīnvielas noteikšana izelpas kondensātā [181].

Ne veseliem cilvēkiem, ne bronhiālās astmas slimniekiem netika novērota krēpu supernatanta GPx aktivitātes ietekme uz urīnvielas relatīvo koncentrāciju krēpu supernatantā, turpretī HOPS slimniekiem urīnvielas relatīvā koncentrācija krēpu supernatantā vājas glutaciona preoksidāzes aktivitātes gadījumā bija būtiski lielāka nekā veseliem cilvēkiem un bronhiālās astmas slimniekiem. Savukārt pastiprinātas GPx aktivitātes gadījumā urīnvielas relatīvā koncentrācija ierosinātās krēpās HOPS slimnieku grupā mazinājās eksponenciāli līdz veselo cilvēku un astmas slimnieku grupas līmenim. Šo efektu var skaidrot ar glutaciona redukcijas un oksidācijas sistēmas būtisko nozīmi elpceļu epitēlija primārajā aizsardzībā pret brīvajiem radikāļiem, kas savukārt nepietiekamas antioksidatīvās aizsardzības dēļ bojā elpceļu epitēliju un palielina tā caurlaidību [22, 64, 101, 290, 300, 408, 423]. Kā iepriekš minējām, urīnvielas relatīvā koncentrācija raksturo elpceļu epitēlija caurlaidību, kas, iespējams, saistīta ar tā bojājumu pakāpi. Vājas GPx aktivitātes gadījumā HOPS slimniekiem ir nepietiekami aizsargāts elpceļu epitēlijs no brīvajiem radikāļiem, kas



izraisījuši tā bojājumu. Savukārt pietiekami lielas GPx aktivitātes gadījumā šie bojājumi HOPS slimnieku grupā ir mazāki un neizraisa epitēlija caurlaidības pieaugumu. Veselo cilvēku grupā arī vājāka GPx vai arī citu antioksidantu aktivitāte ir pietiekama, lai nodrošinātu elpceļu epitēlija antioksidatīvo aizsardzību un novērstu tā bojājumus. Kā zināms, HOPS slimniekiem antioksidatīvajai sistēmai elpceļu epitēlijs jāaizsargā ne tikai no tabakas dūmos esošiem oksidantiem, bet arī no oksidantiem, ko izdala HOPS slimnieku elpceļos palielinātā skaitā esošie un aktivētie neitrofilie leukocīti un citas iekaisumšūnas. Savukārt astmas gadījumā, iespējams, sabiezētā elpceļu bazālā membrāna neatkarīgi no elpceļu epitēlija bojājuma pakāpes ierobežo urīnvielas difūziju caur elpceļu sienu un urīnvielas relatīvā koncentrācija nemainās.

Urīnvielas relatīvajai koncentrācijai ierosināto krēpu supernatantā tika novērota funkcionāla saistība arī ar glutationa peroksidāzes aktivitāti asins plazmā. Veselu cilvēku grupā, palielinoties plazmas GPx aktivitātei, novēroja būtisku urīnvielas relatīvās koncentrācijas mazināšanos ierosināto krēpu supernatantā. Turpretī HOPS slimnieku grupā, palielinoties plazmas GPx aktivitātei, būtiski palielinājās urīnvielas relatīvā koncentrācija krēpu supernatantā. Savukārt bronhiālās astmas slimnieku grupā plazmas GPx aktivitātes ietekmē netika novērotas nekādas ticamas pārmaiņas urīnvielas relatīvajā koncentrācijā krēpu supernatantā. Astmas gadījumā, līdzīgi kā minējam iepriekš, urīnvielas relatīvās koncentrācijas nemainīšanos, iespējams, var skaidrot ar sabiezsto bazālo membrānu, kas neatkarīgi no elpceļu epitēlija bojājumiem varbūt ir galvenais urīnvielas difūziju ierobežojošais faktors. Veseliem cilvēkiem urīnvielas relatīvās koncentrācijas mazināšanās, pieaugot plazmas GPx aktivitātei, iespējams, saistīta ar asinsvadu endotēlija un elpceļu epitēlija caurlaidības mazināšanos šo šūnu labākas antioksidatīvās aizsardzības dēļ. Turpretī HOPS slimnieku grupā novērotais urīnvielas relatīvās koncentrācijas krēpās pieaugums, pieaugot GPx aktivitātei plazmā, ir samērā neskaidrs. Varbūt tā ir organisma ģeneralizēta atbildreakcija uz paaugstinātu iekaisuma izraisītu oksidatīvo stresu plaušu audos. Nepietiekama antioksidatīvās aizsardzības sistēmas aktivitāte HOPS slimnieku elpceļos nespēj novērst iekaisuma pastiprināto oksidatīvo stresu, un organisms palielina ģeneralizētu antioksidatīvo aizsardzību. Jo lielāks antioksidatīvās aizsardzības deficīts plaušās, jo lielāka šā ģeneralizētā antioksidatīvā atbilde, kas tomēr ir nepietiekama, lai novērstu elpceļu epitēlija bojājumus un palielinātu urīnvielas caurlaidību elpceļos.

Apkopojot iepriekš minēto, var secināt, ka HOPS slimniekiem ir palielināta elpceļu epitēlija caurlaidība un, smēķēšanas dēļ pieaugot pakgadu skaitam, šī caurlaidība vēl vairāk palielinās, par ko liecina sākumā paaugstinātā urīnvielas relatīvā koncentrācija ierosinātās krēpās, kura, palielinoties izsmēķēto pakgadu skaitam, vēl vairāk pieaug. Ja ir vāja GPx aktivitātes ierosinātās krēpās, HOPS slimniekiem ir nepietiekami aizsargāts elpceļu epitēlijs no brīvajiem radikāļiem, kas, iespējams, izraisījis tā bojājumus, par ko liecina palielinātā urīnvielas relatīvā koncentrācija krēpās HOPS slimniekiem ar vāju krēpu GPx aktivitāti. Savukārt pietiekami lielas krēpu GPx aktivitātes gadījumā šie bojājumi HOPS slimnieku grupā ir diezgan mazi un neizraisa epitēlija caurlaidības pieaugumu, uz ko norāda urīnvielas relatīvās koncentrācijas mazināšanās. Turpretī HOPS slimnieku grupā novērotais urīnvielas relatīvās koncentrācijas krēpās pieaugums, pieaugot GPx aktivitātei plazmā, ir organisma ģeneralizēta atbildreakcija uz paaugstinātu iekaisuma izraisītu oksidatīvo stresu plaušu audos, ko nespēj novērst lokālā antioksidatīvā aizsardzība. Bronhiālās astmas slimniekiem arī bronhu epitēlija caurlaidība, iespējams, ir palielināta, tomēr urīnvielas difūziju stipri ierobežo kāds cits faktors – iespējams, sabiezētā elpceļu bazālā membrāna, par ko bez urīnvielas relatīvās koncentrācijas mazināšanās, pieaugot krēpu ierosināšanas laikam, par spīti astmai raksturīgajam bronhu epitēlija bojājumam, liecina arī urīnvielas relatīvās koncentrācijas nemainīšanās, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam, kā arī nemainīšanās atkarībā no GPx aktivitātes krēpās un asins plazmā. Veseliem cilvēkiem elpceļu epitēlija caurlaidība ir mazāka nekā HOPS un, iespējams, arī astmas slimniekiem. Smēķēšanas dēļ šī caurlaidība palielinās, bet daļa konstatētās caurlaidības palielināšanās, iespējams, ir uz mazāka nepieciešamā krēpu ierosināšanas laika rēķina (urīnviela mazāk atšķaidās) veseliem smēķētājiem ar lielu smēķēšanas stāžu. Pie kam, veselo cilvēku grupā nenovēroja krēpu supernatanta GPx aktivitātes ietekmi uz elpceļu urīnvielas caurlaidību, kas bija vājināta un liecina par pietiekami labu elpceļu antioksidatīvo aizsardzību. Veseliem cilvēkiem urīnvielas relatīvās koncentrācijas mazināšanās, pieaugot plazmas GPx aktivitātei, iespējams, saistīta ar asinsvadu endotēlija un elpceļu epitēlija caurlaidības mazināšanos šo šūnu labākas antioksidatīvās aizsardzības dēļ.

## 2.5. Alfa-1 antiproteāze

Kā redzams no mūsu pētījuma datiem,  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija asins plazmā veselu cilvēku un HOPS slimnieku grupā bija vienāda un vienādi ticami palielinājās, palielinoties izsmēķēto pakgadu skaitam. Astmas slimnieku grupā  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija plazmā arī nedaudz pieauga, pieaugot pakgadu skaitam, tomēr šis pieaugums nebija statistiski ticams, kaut arī pieauguma ātrums ticami neatšķīrās no veselo cilvēku un HOPS slimnieku grupas, ko varbūt var skaidrot ar nepietiekamu grupā iekļauto astmas slimnieku skaitu ar lielu smēķēšanas stāžu.

Mēs novērojām arī funkcionālu sakarību starp neitrofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās un  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrāciju asins plazmā. HOPS slimniekiem atklāja visstraujāko  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas palielināšanos plazmā, pieaugot neitrofilo leukocītu skaitam krēpās. Arī veselu cilvēku grupā novēroja  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas palielināšanās tendenci pieaugot neitrofilo leukocītu skaitam ierosinātās krēpās. Turpretī astmas slimniekiem nenovēroja ticamas  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas pārmaiņas atkarībā no neitrofilo leukocītu skaita ierosinātās krēpās. Savukārt  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijai plazmā HOPS slimniekiem ar mazu neitrofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās, bija tendence būt zemākai salīdzinājumā ar astmas slimniekiem novēroto.

$\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas palielināšanos plazmā, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam HOPS slimnieku un veselu cilvēku grupā, var skaidrot ar neitrofilo leukocītu skaita pieaugumu ierosinātās krēpās, pieaugot smēķēšanas stāžam šais grupās. Kā aprakstīts iepriekš (sk. 1.3. apakšnodaļu "Neitrofilie leukocīti" Diskusijas nodaļā), neitrofilo leukocītu skaits ierosinātās krēpās gan veselo cilvēku, gan HOPS slimnieku grupā pieauga vienādi ātri izsmēķēto pakgadu ietekmē, tomēr HOPS slimniekiem tas bija būtiski lielāks, jau maza smēķēšanas stāža gadījumā un palielināts saglabājās, arī pieaugot pakgadu skaitam.  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija, palielinoties neitrofilo leukocītu skaitam ierosinātās krēpās, visstraujāk pieauga tieši HOPS slimniekiem, lai gan tās palielināšanās tendenci novēroja arī veselu cilvēku grupā. Kā zināms, tieši neitrofilie leukocīti ir galvenais elastāzes avots elpceļos, kuras inaktivācijai nepieciešams  $\alpha_1$ -antitripsīns [473, 516]. Bez tam neitrofilie leukocīti ir nozīmīgs oksidantu avots, kas var oksidatīvi degradēt un inaktivēt  $\alpha_1$ -antitripsīnu [79, 242, 318]. Kā aprakstīts iepriekš (sk. 2.1. apakšnodaļu "Glutaciona peroksidāze" Diskusijas nodaļā), GPx aktivitāte ticami mazinājās HOPS slimnieku krēpās pieaugot

izsmēķēto pakgadu skaitam, bez tam arī kopējā antioksidatīvā aizsardzība HOPS slimniekiem bija vājināta, par ko liecina paaugstinātā substrāta oksidējamība HOPS slimnieku krēpās (sk. 2.3. apakšnodaļu “Substrāta oksidējamība” Diskusijas nodaļā). Tāpēc HOPS slimniekiem, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam un palielinoties neitrofilajam iekaisumam, nepieciešama arvien lielāka  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija plaušās, lai aizsargātu plaušu audus no elastāzes izraisītas degradācijas. Pie tam jākompensē arī oksidantu izraisītā  $\alpha_1$ -antitripsīna degradācija. Tā kā  $\alpha_1$ -antitripsīns tiek sintezēts nevis plaušās, bet aknās [474, 516], tad, palielinoties tā sintēzei, palielinās arī tā koncentrācija asinīs, ar kurām  $\alpha_1$ -antitripsīnu nogādā plaušās. Tāpēc, kaut arī HOPS slimniekiem visstraujāk palielinās  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija asinīs, pieaugot neitrofilam iekaisumam plaušās, tomēr tā koncentrācija HOPS slimnieku plaušās ir nepietiekama, lai inaktivētu elastāzi [441, 516]. Par to liecina citu autoru novērotā palielinātā elastāzes aktivitāte plaušās [221, 516], kā arī HOPS slimniekiem novērotais plaušu elasticitātes zudums un FEV<sub>1</sub> kritums, ko izraisījusi plaušu elastīgā karkasa degradācija [473, 516]. Piemēram, Viņola novērojis būtiski palielinātu elastāzes aktivitāti un koncentrāciju ierosinātās krēpās HOPS slimniekiem salīdzinājumā ar veseliem nesmeķētājiem un veseliem smēķētājiem, bet veseliem smēķētājiem lielāku nekā veseliem nesmeķētājiem [516]. HOPS un astmas slimniekiem viņš novēojis ticamu korelāciju starp neitrofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās, elastāzes aktivitāti un koncentrāciju ierosinātās krēpās [516]. Arī  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija ierosinātās krēpās HOPS un bronhiālās astmas slimniekiem viņš novēroja augstāku nekā veseliem nesmeķētājiem un smēķētājiem [516]. Kaut arī veselu cilvēku grupā konstatējām  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas pieaugumu asinīs līdzīgu kā HOPS slimniekiem, pieaugot smēķēšanas stāžam, un neitrofilo leukocītu skaitam krēpās, kā arī pašu neitrofilo leukocītu skaits abām grupām līdzīgi pieauga smēķēšanas ietekmē, tomēr neitrofilo leukocītu skaits krēpās veseliem cilvēkiem līdzīgas smēķēšanas anamnēzes gadījumā bija zemāks kā HOPS slimniekiem un tiem bija labāka kopējā antioksidatīvā aizsardzība nekā HOPS slimniekiem. Tāpēc ar asinīm atnesot līdzīgu  $\alpha_1$ -antitripsīna daudzumu kā HOPS slimniekiem vienādas smēķēšanas anamnēzes gadījumā, tas tiek mazāk oksidatīvi inaktivēts, un nepieciešamība pēc tā veseliem cilvēkiem plaušās ir mazāka. Līdz ar to  $\alpha_1$ -antitripsīna pienesums ar asinīm plaušās veseliem smēķētājiem ir pietiekams, lai novērstu pastiprinātu plaušu elastīgā karkasa degradāciju.

Astmas slimniekiem ar mazu neitrofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija bija augstāka nekā HOPS slimniekiem ar līdzīgu neitrofilo leukocītu skaitu, tomēr, pieaugot neitrofilo leukocītu skaitam, astmas slimniekiem šī  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija nemainījās atšķirībā no pārējām grupām. To var skaidrot ar mazāku oksidatīvo stresu nekā HOPS gadījumā un iespējami neefektīvāku kompensācijas mehānismu kā veseliem cilvēkiem. Astmas slimniekiem substrāta oksidējamība nebija tik liela kā HOPS slimniekiem un bija tikai nedaudz nebūtiski lielāka kā veseliem cilvēku, arī neitrofilo leukocītu skaits krēpās bija līdzīgs kā veselo cilvēku grupā un pieaugot smēķēšanas stāžam, astmas slimniekiem tas palielinājās līdzī kā veseliem cilvēkiem. Tāpēc iespējams, astmas gadījumā  $\alpha_1$ -antitripsīna deficīts elpceļos nav tik liels kā HOPS gadījumā, bet ilgstošas smagas astmas vai smēķēšanas gadījumā pieaugošais neitrofilais iekaisums [248, 440] var izraisīt  $\alpha_1$ -antitripsīna deficītu plaušās, un arī astmas gadījumā attīstās elpceļu nereversīva obstrukcija. Par to netieši liecina citu autoru novērotā  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas korelācija ar elstāzes koncentrāciju ierosinātās krēpās astmas slimniekiem [516]. Pie kam astmas slimniekiem novērota ticama korelācija starp neitrofilo leukocītu skaitu un elastāzes koncentrāciju un aktivitāti ierosinātās krēpās [516].

Tāpēc varm secināt, ka, palielinoties smēķēšanas stāžam vienādi pieaug  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija plazmā veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem, kam cēlonis ir plaušu neitrofilā iekaisuma pastiprināšanās - rodas elastāzes aktivitātes pieaugums un oksidatīvais stress, kas pastiprina  $\alpha_1$ -antitripsīna degradāciju. Tomēr HOPS slimniekiem neitrofilo leukocītu skaits krēpās ir lielāks, tie ir aktivēti un antioksidatīvā aizsardzība vājāka nekā veseliem cilvēkiem un  $\alpha_1$ -antitripsīns degradējas straujāk. Uz to norāda arī būtiski palielinātā  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācija plazmā HOPS slimniekiem ar lielu neitrofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās, kā arī mazāka  $\alpha_1$ -antitripsīna koncentrācijas palielināšanās veseliem cilvēkiem ar lielu neitrofilo leukocītu skaitu ierosinātās krēpās.

### **3. Krēpu ierosināšanas ātrums**

Mēs krēpu produktivitātes atspoguļošanai krēpu ierosināšanas laikā ieviesām jaunu raksturlielumu - krēpu ierosināšanas ātrumu. Tas ir krēpu daudzums gramos, kuru vidēji iegūst 1 min krēpu ierosināšanas laikā. Tas tika darīts tāpēc, jo par produktivitātes raksturlielumu nevarēja izmantot krēpu masu, jo, lai iegūtu turpmākām analīzēm nepieciešamo krēpu daudzumu (aptuveni 5 ml jeb 5 g) dažādiem

pacientiēm bija nepieciešams atšķirīgs krēpu ierosināšanas laiks. Arī krēpu ierosināšanas laiku nevarēja izmantot par krēpu produktivitātes raksturlielumu, jo krēpas tiek diskrēti iegūtas vairāku atkrēpošanu procesā un trauciņā to daudzums sākumā tika vērtēts vizuāli - samērā neprecīzi. Tikai pēc krēpu ierosināšanas pārtraukšanas tās tika nosvērtas.

Mūsu pētījumā gan veselīem cilvēkiem, gan bronhiālās astmas slimniekiem mūžā izsmēķēto pakgažu skaits būtiski palielināja krēpu ierosināšanas ātrumu, pie kam astmas slimniekiem, pieaugot pakgažu skaitam, krēpu ierosināšanas ātrums palielinājās nedaudz ātrāk kā veselīem cilvēkiem, lai gan šī atšķirība nebija statistiski ticama. Pie tam veselo cilvēku un astmas slimnieku grupām šis ierosināšanas ātruma palielinājums bija visstraujākais jau maza mūžā izsmēķētā tabakas daudzuma gadījumā, bet palielinoties mūžā izsmēķētā tabakas daudzumam, ātrums auga jau krietni lēnāk, kas atbilst pakāpes funkcionālai sakarībai. Turpretī HOPS slimnieku grupai jau ar mazu smēķēšanas stāžu un nesmēķējošiem HOPS slimniekiem bija būtiski palielināts krēpu ierosināšanas ātrums salīdzinājumā ar veselo cilvēku un astmas slimnieku grupu ar līdzīgu smēķēšanas anamnēzi. Palielinoties izsmēķēto pakgažu skaitam, HOPS slimniekiem krēpu ierosināšanas ātrums būtiski nemainījās, saglabājoties sākotnēji augstajā līmenī.

Mūsu pētījumā novēroto krēpu ierosināšanas ātruma palielināšanos, pieaugot mūžā izsmēķēto pakgažu skaitam, veselo cilvēku un astmas slimnieku grupām, kā arī neatkarīgi no izsmēķēto pakgažu skaita palielināto krēpu ierosināšanas ātrumu HOPS slimnieku grupai var skaidrot ar trim faktoriem, kam par iemeslu ir tabakas dūmu darbība un bronhu iekaisums. Pirmkārt, bronhu gļotu dziedzeru hiperplāzija un palielināta aktivitāte. Otrkārt, palielināts kausšūnu skaits un palielināta aktivitāte bronhu epitēlijā. Treškārt, bronhu epitēlija, bronhu asinsvadu endotēlija un alveolu palielināta caurlaidība. Bronhu dziedzeru hiperplāzija un gļotu hipersekrecija pārsvarā novērota HOPS slimniekiem, pie kam atšķirībā no veselīem smēķētājiem HOPS slimnieku bronhu gļotu dziedzeros konstatēta neitrofilo leukocītu infiltrācija, kas norāda uz neitrofilo iekaisumu šajos dziedzeros [317]. Savukārt kausiņšumu hiperplāzija novērota gan veselīem smēķētājiem, gan smēķējošiem HOPS slimniekiem. Tas liecina par cigarešu dūmu izraisītu procesu [317]. Arī citi autori norāda uz būtisku palielinātu kausšūnu skaitu smēķētāju elpceļos [145, 312, 413, 417, 432, 472, 501]. Arī pētījumos ar dzīvniekiem novērots būtisks kausšūnu skaita palielinājums elpceļos pēc četrus mēnešus iedarbības ar tabakas dūmiem [537]. Uz

bronhu epitēlija un bronhu asinsvadu endotēlija caurlaidības palielināšanos tabakas dūmu ietekmē norāda albumīna palielināta koncentrācija smēķētāju ierosinātās krēpās un BAL [339, 516]. Tāpat par palielinātu bronhu epitēlija, asinsvadu endotēlija un alveolu caurlaidību liecina mazinātais tehnēcija ( $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ ) pusizskalošanās periods smēķētājiem, kurš vēl vairāk mazinās tūlīt pēc smēķēšanas [339]. Arī pētījumos *in vitro* novērota būtiska bronhu epitēlija kultūras caurlaidības palielināšanās pēc iedarbības ar tabakas dūmiem. Pie kam vislielākā caurlaidības palielināšanās novērota kultūrās, kas iegūtas no HOPS slimniekiem, vidēja - no veseliem nesmēķētājiem, bet vismazākā - no veseliem smēķētājiem [423]. Uz plazmas transudācijas palielināšanos, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam, netieši norāda arī mūsu pētījumā novērotā urīnvielas relatīvās koncentrācijas ierosināšanās krēpās procentos no urīnvielas koncentrācijas plazmā palielināšanās, pieaugot izsmēķēto pakgadu skaitam veseliem cilvēkiem un HOPS slimniekiem. Bez iepriekš minētā plazmas transudācijas palielināšanās un Tc pusizskalošanās perioda mazināšanās cēlonis var būt arī tabakas dūmu izraisīti alveolāro epitēlijšūnu bojājumi un alveolu caurlaidības palielināšanās. Kā novērots pētījumos *in vitro*, tabakas dūmi un to kondensāts izraisa II tipa alveolāro epitēlijšūnu bojājumus un caurlaidības palielināšanos, bet, pievienojot GSH, epitēlija caurlaidība mazinās [290, 300]. Tas norāda uz tabakas dūmos esošo oksidantu iesaistīšanos šajā procesā un glutaciona redukcijas un oksidācijas sistēmas nozīmi alveolārā epitēlija aizsardzībā. Arī mūsu pētījumā novērota sākumā palielinātās GPx aktivitātes mazināšanās HOPS slimnieku ierosinātās krēpās, palielinoties izsmēķēto pakgadu skaitam, kas norāda uz oksidantu izraisītu iespējamu GPx inaktivāciju un nepietiekamu tās aktivitāti plaušu antioksidatīvās aizsardzības nodrošināšanā. Arī iekaisums bronhos, īpaši neitrofilais HOPS gadījumā, var palielināt krēpu izdalīšanos. HOPS slimniekiem ar lielāku neitrofījo leukocītu relatīvo skaitu BAL šķidrumā ir lielāka spontāno krēpu producēšana [497]. Arī mūsu pētījumā nesmēķējošiem un mazsmēķējošiem HOPS slimniekiem ir būtiski palielināts krēpu ierosināšanas ātrums, kas saglabājas nemainīgs arī liela izsmēķēto pakgadu skaita gadījumā, kas skaidrojams ar neitofīlo leukocītu iekaisumu pašos bronhu gļotu dziedzeros [317]. Neitrofilo leukocītu elastāze HOPS slimniekiem ir viens no faktoriem, kas palielina gļotu sekrēciju [473]. Bez tam neitrofilo leukocītu elastāze var ksantīndehidrolāzi (XD) pārvērst par ksantīnoksidāzi (XO) [385], kuras sintezētie oksidanti var izraisīt lipīdu mediatoru izdalīšanos no

granulocītiem [291], kas savukārt palielina elpceļu asinsvadu caurlaidību un plazmas eksudāciju [334].



## **Secinājumi**

- 1. Smēķēšana pastiprina neitrofilo iekaisumu bronhos un veicina leukopēzi kaulu smadzenēs smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas, bronhiālās astmas, bet īpaši HOPS slimniekiem. Neitrofilā iekaisuma intensitāte elpceļos ir tieši saistīta ar smēķēšanas stāžu.**
- 2. Smēķēšana izraisa eozinofilo iekaisumu bronhos smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas un HOPS slimniekiem.**
- 3. Nesmēķējošiem astmas slimniekiem jau sākotnēji vērojams eozinofils iekaisums bronhos. Smēķēšana astmas slimniekiem neizraisa turpmāku eozinofilā iekaisuma pastiprināšanos.**
- 4. Smēķēšanas ietekmē HOPS slimniekiem aktivējas glutaciona antioksidatīvā aizsargsistēma asins plazmā. Savukārt glutaciona sistēmas aktivitāte plaušās samazinās pieaugot smēķēšanas stāžam.**
- 5. Smēķēšana palielina bronhu un alveolārā epitēlija caurlaidību gan smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas, gan īpaši HOPS slimniekiem, kas var būt saistīts ar nomāktu GPx aktivitāti.**
- 6. Smēķēšana palielina gļotu izdalīšanos no elpceļiem gan smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas, gan bronhiālās astmas slimniekiem, bet astmas slimniekiem šī ietekme ir lielāka.**
- 7. HOPS slimniekiem gļotu producēšana ir pastiprināta neatkarīgi no smēķēšanas un nemainās smēķēšanas ietekmē.**
- 8. Katalāzes aktivitāte plaušās ir atkarīga no neitrofilo leukocītu iesaistīšanās HOPS slimniekiem, bet no eozinofilajiem leukocītiem - astmas slimniekiem.**

**Pateicība**

Autors izsaka pateicību Dr. Ph., Dr. Med., profesoram Immanuelam Taivanam par kompetentu darba vadīšanu.

Pateicos kolēģiem Dr. Ph. Guntai Strazdai un Dr. Ph., Dr. Med. Mārim Bukovskim par ieguldīto darbu disertācijas tapšanā.

Paldies sadarbības partneriem Dr. Ph. Andrejam Šķesterim, Dr. Ph., Dr. Med. Ausmai Kumerovai un Dr. Ph., Dr. Med. Annai Lecei par sadarbību darbam nepieciešamo bioķīmisko analīžu veikšanā.

Tencinu Dr. Ph. Antru Jurku par palīdzību darba tapšanā, kā arī savus vecākus par sapratni un atbalstu.

## Literatūras saraksts

1. *Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med*, 1995. **152**(5 Pt 2): p. S77-121.
2. Abe, T., et al., *Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. J Clin Invest*, 1991. **87**(6): p. 2207-15.
3. Aebi, H., *Catalase in vitro. Methods Enzymol*, 1984. **105**: p. 121-6.
4. Ahmed, T. and B. Marchette, *Hypoxia enhances nonspecific bronchial reactivity. Am Rev Respir Dis*, 1985. **132**(4): p. 839-44.
5. Aikawa, T., et al., *Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. Chest*, 1992. **101**(4): p. 916-21.
6. Aitken, M.L., et al., *Analysis of sequential aliquots of hypertonic saline solution-induced sputum from clinically stable patients with cystic fibrosis. Chest*, 2003. **123**(3): p. 792-9.
7. Alam, R., et al., *RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. J Immunol*, 1993. **150**(8 Pt 1): p. 3442-8.
8. Alvarez, M.J., et al., *Airway inflammation in asthma and perennial allergic rhinitis. Relationship with nonspecific bronchial responsiveness and maximal airway narrowing. Allergy*, 2000. **55**(4): p. 355-62.
9. Amoli, K., *Bronchopulmonary disease in Iranian housewives chronically exposed to indoor smoke. Eur Respir J*, 1998. **11**(3): p. 659-63.
10. Anderson, R., et al., *Passive smoking by humans sensitizes circulating neutrophils. Am Rev Respir Dis*, 1991. **144**(3 Pt 1): p. 570-4.
11. Anderson, S.D., *Challenge tests to assess airway hyperresponsiveness and efficacy of drugs used in the treatment of asthma. J Aerosol Med*, 1996. **9**(1): p. 95-109.
12. Aoshiba, K., A. Nagai, and K. Konno, *Nicotine prevents a reduction in neutrophil filterability induced by cigarette smoke exposure. Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **150**(4): p. 1101-7.
13. Aoshiba, K., et al., *Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis. J Lab Clin Med*, 1996. **127**(2): p. 186-94.
14. Aoshiba, K. and A. Nagai, *[Apoptosis in chronic obstructive pulmonary disease]. Nippon Rinsho*, 1999. **57**(9): p. 1972-5.
15. Arima, M., et al., *Expression of interleukin-16 by human epithelial cells. Inhibition by dexamethasone. Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **21**(6): p. 684-92.
16. Arnoux, B., et al., *Release of PAF-acether from human blood monocytes. Agents Actions*, 1982. **12**(5-6): p. 713-6.
17. Arshad, S.H., K.S. Babu, and S. Holgate, *Anti-IgE therapy in asthma and allergy*. 2001, London: Martin Dunitz Ltd The Livery House. 67.
18. Aubas, P., et al., *Decreased suppressor cell activity of alveolar macrophages in bronchial asthma. Am Rev Respir Dis*, 1984. **130**(5): p. 875-8.
19. Aust, S.D., L.A. Morehouse, and C.E. Thomas, *Role of metals in oxygen radical reactions. J Free Radic Biol Med*, 1985. **1**(1): p. 3-25.
20. Avissar, N., et al., *Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. Am J Physiol*, 1994. **266**(2 Pt 1): p. C367-75.

21. Avissar, N., et al., *Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells*. Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 1): p. L173-82.
22. Avissar, N.E., et al., *Ozone, but not nitrogen dioxide, exposure decreases glutathione peroxidases in epithelial lining fluid of human lung*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(4 Pt 1): p. 1342-7.
23. Ayars, G.H., et al., *Eosinophil- and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury*. J Allergy Clin Immunol, 1985. **76**(4): p. 595-604.
24. Bacci, E., et al., *Comparison between hypertonic and isotonic saline-induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma*. Clin Exp Allergy, 1996. **26**(12): p. 1395-400.
25. Balbi, B., et al., *Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis*. Eur Respir J, 1997. **10**(4): p. 846-50.
26. Balzano, G., et al., *Eosinophilic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. Relationship with neutrophils and airway function*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(5 Pt 1): p. 1486-92.
27. Barker, R.D., et al., *Risk factors for bronchial hyperresponsiveness in workers exposed to acid anhydrides*. Eur Respir J, 2000. **15**(4): p. 710-5.
28. Barnes, N.C., P.J. Piper, and J.F. Costello, *Comparative effects of inhaled leukotriene C4, leukotriene D4, and histamine in normal human subjects*. Thorax, 1984. **39**(7): p. 500-4.
29. Barnes, P., *Managing chronic obstructive pulmonary disease*, ed. L. Willatt. 2000, London: Science Press Limited. 80.
30. Barnes, P.J., *Asthma as an axon reflex*. Lancet, 1986. **1**(8475): p. 242-5.
31. Barnes, P.J., K.F. Chung, and C.P. Page, *Inflammatory mediators and asthma*. Pharmacol Rev, 1988. **40**(1): p. 49-84.
32. Barnes, P.J., *Nitric oxide and airway disease*. Ann Med, 1995. **27**(3): p. 389-93.
33. Barnes, P.J., *NO or no NO in asthma?* Thorax, 1996. **51**(2): p. 218-20.
34. Barnes, P.J. and M. Karin, *Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. N Engl J Med, 1997. **336**(15): p. 1066-71.
35. Bast, A., G.R. Haenen, and C.J. Doelman, *Oxidants and antioxidants: state of the art*. Am J Med, 1991. **91**(3C): p. 2S-13S.
36. Bates, M.E., V.L. Green, and P.J. Bertics, *ERK1 and ERK2 activation by chemotactic factors in human eosinophils is interleukin 5-dependent and contributes to leukotriene C(4) biosynthesis*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 10968-75.
37. Bayram, H., et al., *Effect of ozone and nitrogen dioxide on the release of proinflammatory mediators from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients in vitro*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(2): p. 287-94.
38. Beasley, R., et al., *Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation*. Am Rev Respir Dis, 1989. **139**(3): p. 806-17.
39. Becklake, M.R., *Occupational exposures: evidence for a causal association with chronic obstructive pulmonary disease*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(3 Pt 2): p. S85-91.
40. Behera, D. and S.K. Jindal, *Respiratory symptoms in Indian women using domestic cooking fuels*. Chest, 1991. **100**(2): p. 385-8.

41. Belcher, N.G., et al., *Pathogenetic mechanisms of exercise-induced asthma and the refractory period*. N Engl J Allergy Proc, 1988. **9**(3): p. 199-201.
42. Bentley, A.M., et al., *Activated T-lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **89**(4): p. 821-9.
43. Bentley, A.M., et al., *Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(2): p. 500-6.
44. Bentley, A.M., et al., *Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **8**(1): p. 35-42.
45. Bienenstock, J., et al., *Inflammatory cells and the epithelium. Mast cell/nerve interactions in the lung in vitro and in vivo*. Am Rev Respir Dis, 1988. **138**(6 Pt 2): p. S31-4.
46. Birring, S.S., et al., *Clinical, radiologic, and induced sputum features of chronic obstructive pulmonary disease in nonsmokers: a descriptive study*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(8): p. 1078-83.
47. Blair, R.J., et al., *Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor*. J Clin Invest, 1997. **99**(11): p. 2691-700.
48. Bluhm, A.L., J. Weinstein, and J.A. Sousa, *Free radicals in tobacco smoke*. Nature, 1971. **229**(5285): p. 500.
49. Bochner, B.S. and R.P. Schleimer, *The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **94**(3 Pt 1): p. 427-38; quiz 439.
50. Borish, L. and B.Z. Joseph, *Inflammation and the allergic response*. Med Clin North Am, 1992. **76**(4): p. 765-87.
51. Borish, L., et al., *Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 beta in asthma. Inhibition with corticosteroids*. J Immunol, 1992. **149**(9): p. 3078-82.
52. Boulet, L.P., et al., *Airway inflammation after removal from the causal agent in occupational asthma due to high and low molecular weight agents*. Eur Respir J, 1994. **7**(9): p. 1567-75.
53. Bousquet, J., et al., *Bronchial elastic fibers in normal subjects and asthmatic patients*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(5): p. 1648-54.
54. Bousquet, J., et al., *Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1720-45.
55. Bowler, S.D., S.M. Smith, and P.S. Lavercombe, *Heparin inhibits the immediate response to antigen in the skin and lungs of allergic subjects*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(1): p. 160-3.
56. Bradding, P., et al., *Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **10**(5): p. 471-80.
57. Bradding, P., et al., *15-lipoxygenase immunoreactivity in normal and in asthmatic airways*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(4): p. 1201-4.
58. Bradley, B.L., et al., *Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma:*

- comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness.* J Allergy Clin Immunol, 1991. **88**(4): p. 661-74.
59. Brewster, C.E., et al., *Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1990. **3**(5): p. 507-11.
  60. Bridges, A.B., et al., *Age, sex, cigarette smoking and indices of free radical activity in healthy humans.* Eur J Med, 1993. **2**(4): p. 205-8.
  61. Bridges, R.B., M.C. Fu, and S.R. Rehm, *Increased neutrophil myeloperoxidase activity associated with cigarette smoking.* Eur J Respir Dis, 1985. **67**(2): p. 84-93.
  62. Brightling, C.E., et al., *Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial.* Lancet, 2000. **356**(9240): p. 1480-5.
  63. Broide, D.H., M.M. Paine, and G.S. Firestein, *Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics.* J Clin Invest, 1992. **90**(4): p. 1414-24.
  64. Bucala, R., *Lipid and lipoprotein oxidation: basic mechanisms and unresolved questions in vivo.* Redox Report, 1996. **2**(5): p. 291-307.
  65. Burnett, D., et al., *Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis.* Lancet, 1987. **2**(8567): p. 1043-6.
  66. Burrows, B., et al., *Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function.* Am Rev Respir Dis, 1977. **115**(2): p. 195-205.
  67. Busse, W.W., *The role of respiratory infections in airway hyperresponsiveness and asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(5 Pt 2): p. S77-9.
  68. Busse, W.W. and J.B. Sedgwick, *Eosinophil eicosanoid relations in allergic inflammation of the airways.* Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res, 1994. **22**: p. 241-9.
  69. Cai, Y., et al., *Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children.* Eur Respir J, 1998. **11**(4): p. 848-53.
  70. Cairns, J.A. and A.F. Walls, *Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression.* J Immunol, 1996. **156**(1): p. 275-83.
  71. Calabrese, C., et al., *Arachidonic acid metabolism in inflammatory cells of patients with bronchial asthma.* Allergy, 2000. **55**(Suppl 61): p. 27-30.
  72. Calhoun, W.J., et al., *Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects.* Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(2 Pt 1): p. 317-25.
  73. Calhoun, W.J., et al., *Increased airway inflammation with segmental versus aerosol antigen challenge.* Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(6 Pt 1): p. 1465-71.
  74. Calhoun, W.J., et al., *A common cold virus, rhinovirus 16, potentiates airway inflammation after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects.* J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2200-8.
  75. Cambrey, A.D., et al., *Insulin-like growth factor I is a major fibroblast mitogen produced by primary cultures of human airway epithelial cells.* Clin Sci (Lond), 1995. **89**(6): p. 611-7.

76. Campbell, A.M., et al., *Functional characteristics of bronchial epithelium obtained by brushing from asthmatic and normal subjects*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(3): p. 529-34.
77. Cantin, A.M., et al., *Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione*. J Appl Physiol, 1987. **63**(1): p. 152-7.
78. Cantin, A.M., et al., *Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract*. J Clin Invest, 1990. **86**(3): p. 962-71.
79. Carp, H., et al., *Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 2041-5.
80. Carroll, N., et al., *The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(2): p. 405-10.
81. Casado, A., et al., *[Superoxide dismutase and catalase levels in diseases of the aged]*. Gac Med Mex, 1998. **134**(5): p. 539-44.
82. Casale, T.B., et al., *Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness*. J Clin Invest, 1987. **79**(4): p. 1197-203.
83. Cataldo, D., et al., *MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Int Arch Allergy Immunol, 2000. **123**(3): p. 259-67.
84. Celli, B., J. Benditt, and R. Albert, *Chronic obstructive pulmonary disease*, in *Comprehensive respiratory medicine*, R. Albert, S. Spiro, and J. Jett, Editors. 2001, Harcourt Health Communication, a division of Mosby International Limited: London. p. 37.1-37.24.
85. Chanez, P., et al., *Modulation by interleukin-4 of cytokine release from mononuclear phagocytes in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **94**(6 Pt 1): p. 997-1005.
86. Chen, Y., *Genetics and pulmonary medicine.10: Genetic epidemiology of pulmonary function*. Thorax, 1999. **54**(9): p. 818-24.
87. Chihara, J., et al., *Eosinophil cationic protein induces insulin-like growth factor I receptor expression on bronchial epithelial cells*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **111**(Suppl 1): p. 43-5.
88. Chow, C.K., et al., *Dietary vitamin E and pulmonary biochemical responses of rats to cigarette smoking*. Environ Res, 1984. **34**(1): p. 8-17.
89. Chow, C.K., *Cigarette smoking and oxidative damage in the lung*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **686**: p. 289-98.
90. Church, D.F. and W.A. Pryor, *Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications*. Environ Health Perspect, 1985. **64**: p. 111-26.
91. Church, D.F., T.J. Burkey, and W.A. Pryor, *Preparation of human lung tissue from cigarette smokers for analysis by electron spin resonance spectroscopy*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 665-9.
92. Clark, T., et al., *Global initiative for asthma*. 2002, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health.
93. Cluzel, M., et al., *Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1987. **80**(2): p. 195-201.

94. Cohen, A.B. and H.L. James, *Reduction of the elastase inhibitory capacity of alpha 1-antitrypsin by peroxides in cigarette smoke: an analysis of brands and filters*. Am Rev Respir Dis, 1982. **126**(1): p. 25-30.
95. Cohen, A.B. and M. Rossi, *Neutrophils in normal lungs*. Am Rev Respir Dis, 1983. **127**(2): p. S3-9.
96. Cohen, B.H., et al., *Is ABH nonsecretor status a risk factor for obstructive lung disease?* Am J Epidemiol, 1980. **111**(3): p. 285-91.
97. Coles, S.J., et al., *Effects of leukotrienes C4 and D4 on glycoprotein and lysozyme secretion by human bronchial mucosa*. Prostaglandins, 1983. **25**(2): p. 155-70.
98. Collins, D.S., et al., *Immunoglobulin E-mediated increase in vascular permeability correlates with eosinophilic inflammation*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(3): p. 677-83.
99. Comhair, S.A., et al., *Increased glutathione and glutathione peroxidase in lungs of individuals with chronic beryllium disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(6): p. 1824-9.
100. Comhair, S.A., M.J. Thomassen, and S.C. Erzurum, *Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O(2) or cigarette smoke*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(3): p. 350-4.
101. Comhair, S.A., et al., *Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells*. Faseb J, 2001. **15**(1): p. 70-78.
102. Cook, J.D., C.A. Finch, and N.J. Smith, *Evaluation of the iron status of a population*. Blood, 1976. **48**(3): p. 449-55.
103. Corinti, S., et al., *Major histocompatibility complex-independent recognition of a distinctive pollen antigen, most likely a carbohydrate, by human CD8+ alpha/beta T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 899-908.
104. Corrigan, C.J., et al., *Peripheral blood CD4 but not CD8 t-lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2-type pattern: effect of glucocorticoid therapy*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(5): p. 567-78.
105. Cotran, R.S., S.L. Robbins, and V. Kumar, eds. *Robbins patologic basis of disease*. 5th ed. 1994, W.B. Saunders Company A Division of Harcourt Brace & Company: Philadelphia. 1400.
106. Cowburn, A.S., S.T. Holgate, and A.P. Sampson, *IL-5 increases expression of 5-lipoxygenase-activating protein and translocates 5-lipoxygenase to the nucleus in human blood eosinophils*. J Immunol, 1999. **163**(1): p. 456-65.
107. Cromwell, O., et al., *Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha*. Immunology, 1992. **77**(3): p. 330-7.
108. Cross, C.E., et al., *Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **686**: p. 72-89; discussion 89-90.
109. Cruikshank, W.W., et al., *Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1 alpha) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **13**(6): p. 738-47.



110. Cua, W.O., et al., *Endothelial and epithelial permeabilities to antipyrine in rat and dog lungs*. Am J Physiol, 1990. **258**(5 Pt 2): p. H1321-33.
111. Cutz, E., H. Levison, and D.M. Cooper, *Ultrastructure of airways in children with asthma*. Histopathology, 1978. **2**(6): p. 407-21.
112. Dahlen, S.E., et al., *Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi*. Nature, 1980. **288**(5790): p. 484-6.
113. Dahlen, S.E., et al., *Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(6): p. 3887-91.
114. Damon, M., et al., *Increased generation of the arachidonic metabolites LTB<sub>4</sub> and 5-HETE by human alveolar macrophages in patients with asthma: effect in vitro of nedocromil sodium*. Eur Respir J, 1989. **2**(3): p. 202-9.
115. Daultbaev, N., et al., *Glutathione in induced sputum of healthy individuals and patients with asthma*. Thorax, 2001. **56**(1): p. 13-8.
116. Davidson, A.B., et al., *Bronchoconstrictor effects of leukotriene E<sub>4</sub> in normal and asthmatic subjects*. Am Rev Respir Dis, 1987. **135**(2): p. 333-7.
117. Dayal, H.H., et al., *Passive smoking in obstructive respiratory disease in an industrialized urban population*. Environ Res, 1994. **65**(2): p. 161-71.
118. de Boer, W.I., et al., *Transforming growth factor beta<sub>1</sub> and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(6): p. 1951-7.
119. de Godoy, I., et al., *Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(2): p. 633-7.
120. De Monchy, J.G., et al., *Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions*. Am Rev Respir Dis, 1985. **131**(3): p. 373-6.
121. De Raeve, H.R., et al., *Decreased Cu,Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correction by inhaled corticosteroid in vivo*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 1): p. L148-54.
122. Dekhuijzen, P.N., et al., *Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(3 Pt 1): p. 813-6.
123. del Pozo, V., et al., *Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 859-64.
124. Del Prete, G.F., et al., *Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th<sub>2</sub> cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders*. Eur J Immunol, 1993. **23**(7): p. 1445-9.
125. Dennis, R.J., et al., *Woodsmoke exposure and risk for obstructive airways disease among women*. Chest, 1996. **109**(1): p. 115-9.
126. Devalia, J.L., et al., *Effect of nitrogen dioxide and sulphur dioxide on airway response of mild asthmatic patients to allergen inhalation*. Lancet, 1994. **344**(8938): p. 1668-71.
127. Di Franco, A., et al., *Leukocyte counts in hypertonic saline-induced sputum in subjects with occupational asthma*. Respir Med, 1998. **92**(3): p. 550-7.
128. Di Stefano, A., et al., *Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(3 Pt 1): p. 803-10.
129. Di Stefano, A., et al., *Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(4): p. 1277-85.

130. Diamant, Z., et al., *Effect of inhaled heparin on allergen-induced early and late asthmatic responses in patients with atopic asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(6 Pt 1): p. 1790-5.
131. Diaz-Sanchez, D., et al., *Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern*. J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2406-13.
132. Diem, J.E., et al., *Five-year longitudinal study of workers employed in a new toluene diisocyanate manufacturing plant*. Am Rev Respir Dis, 1982. **126**(3): p. 420-8.
133. DiSilvestro, R.A., et al., *BAL fluid contains detectable superoxide dismutase 1 activity*. Chest, 1998. **113**(2): p. 401-4.
134. Dix, T.A. and J. Aikens, *Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation*. Chem Res Toxicol, 1993. **6**(1): p. 2-18.
135. Djukanovic, R., et al., *Effect of natural allergen exposure during the grass pollen season on airways inflammatory cells and asthma symptoms*. Thorax, 1996. **51**(6): p. 575-81.
136. Doucet, C., et al., *Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2129-39.
137. Drath, D.B., M.L. Karnovsky, and G.L. Huber, *The effects of experimental exposure to tobacco smoke on the oxidative metabolism of alveolar macrophages*. J Reticuloendothel Soc, 1979. **25**(6): p. 597-604.
138. Drost, E.M., et al., *Changes in neutrophil deformability following in vitro smoke exposure: mechanism and protection*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992. **6**(3): p. 287-95.
139. Drumm, K., R. Buhl, and K. Kienast, *Additional NO2 exposure induces a decrease in cytokine specific mRNA expression and cytokine release of particle and fibre exposed human alveolar macrophages*. Eur J Med Res, 1999. **4**(2): p. 59-66.
140. Dubravec, D.B., et al., *Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6758-61.
141. Duhme, H., et al., *Asthma and allergies among children in West and East Germany: a comparison between Munster and Greifswald using the ISAAC phase I protocol. International Study of Asthma and Allergies in Childhood*. Eur Respir J, 1998. **11**(4): p. 840-7.
142. Dunnill, M.S., G.R. Massarella, and J.A. Anderson, *A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema*. Thorax, 1969. **24**(2): p. 176-9.
143. Dusser, D., *[Role of eosinophils in asthma]*. Rev Mal Respir, 2000. **17**(1 Pt 2): p. 195-201.
144. Duthie, G.G., J.R. Arthur, and W.P. James, *Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status*. Am J Clin Nutr, 1991. **53**(4 Suppl): p. 1061S-1063S.
145. Ebert, R.V. and M.J. Terracio, *The bronchiolar epithelium in cigarette smokers. Observations with the scanning electron microscope*. Am Rev Respir Dis, 1975. **111**(1): p. 4-11.
146. Effros, R.M., et al., *Kinetics of urea exchange in air-filled and fluid-filled rat lungs*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 1): p. L619-26.

147. Efthimiadis, A., et al., *Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs phosphate-buffered saline*. Eur Respir J, 1997. **10**(6): p. 1336-40.
148. Ehrlich, R.I., et al., *Risk factors for childhood asthma and wheezing. Importance of maternal and household smoking*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(3 Pt 1): p. 681-8.
149. Eiserich, J.P., et al., *Molecular mechanisms of damage by excess nitrogen oxides: nitration of tyrosine by gas-phase cigarette smoke*. FEBS Lett, 1994. **353**(1): p. 53-6.
150. Elias Hernandez, M.T., et al., *[Risk factors for bronchial asthma in patients with rhinitis]*. Arch Bronconeumol, 2001. **37**(10): p. 429-34.
151. Elsner, J., et al., *Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils*. Eur J Immunol, 1996. **26**(8): p. 1919-25.
152. Evans, D.J., et al., *Priming of circulating human eosinophils following late response to allergen challenge*. Eur Respir J, 1996. **9**(4): p. 703-8.
153. Evsiukova, E.V., *[Melatonin effects on functional activity of platelets in patients with bronchial asthma]*. Ter Arkh, 1999. **71**(12): p. 35-7.
154. Fabbri, L.M., *Airway inflammation in occupational asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(5 Pt 2): p. S80-2.
155. Faber, J.P., et al., *The molecular basis of alpha 1-antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease*. J Hepatol, 1993. **18**(3): p. 313-21.
156. Fahy, J.V., et al., *Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(5): p. 1126-31.
157. Fahy, J.V., et al., *Analysis of cellular and biochemical constituents of induced sputum after allergen challenge: a method for studying allergic airway inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **93**(6): p. 1031-9.
158. Fahy, J.V., et al., *Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation*. J Allergy Clin Immunol, 1995. **95**(4): p. 843-52.
159. Fahy, J.V., et al., *Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(1): p. 53-8.
160. Fenech, A.G. and R. Ellul-Micallef, *Selenium, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in maltese asthmatic patients: effect of glucocorticoid administration*. Pulm Pharmacol Ther, 1998. **11**(4): p. 301-8.
161. Ferrence, R. and M.J. Ashley, *Protecting children from passive smoking*. Bmj, 2000. **321**(7257): p. 310-1.
162. Filip, F., et al., *[The blood enzymatic antioxidative potential in bronchial asthma patients]*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 1999. **103**(3-4): p. 153-7.
163. Fine, J.M., et al., *The role of titratable acidity in acid aerosol-induced bronchoconstriction*. Am Rev Respir Dis, 1987. **135**(4): p. 826-30.
164. Finney, M.J., J.A. Karlsson, and C.G. Persson, *Effects of bronchoconstrictors and bronchodilators on a novel human small airway preparation*. Br J Pharmacol, 1985. **85**(1): p. 29-36.
165. Flint, K.C., et al., *Bronchoalveolar mast cells in extrinsic asthma: a mechanism for the initiation of antigen specific bronchoconstriction*. Br Med J (Clin Res Ed), 1985. **291**(6500): p. 923-6.

166. Ford-Hutchinson, A.W., et al., *Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes*. Nature, 1980. **286**(5770): p. 264-5.
167. Foresi, A., et al., *Eosinophil apoptosis in induced sputum from patients with seasonal allergic rhinitis and with asymptomatic and symptomatic asthma*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **84**(4): p. 411-6.
168. Fraenkel, D.J., et al., *Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(3 Pt 1): p. 879-86.
169. Fujimoto, K., et al., *Eosinophil cationic protein levels in induced sputum correlate with the severity of bronchial asthma*. Chest, 1997. **112**(5): p. 1241-7.
170. Fujimoto, K., et al., *Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema*. Chest, 1999. **115**(3): p. 697-702.
171. Fukuda, T., et al., *Role of interleukin-4 and vascular cell adhesion molecule-1 in selective eosinophil migration into the airways in allergic asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **14**(1): p. 84-94.
172. Fuller, R.W., et al., *Human alveolar macrophage activation: inhibition by forskolin but not beta-adrenoceptor stimulation or phosphodiesterase inhibition*. Pulm Pharmacol, 1988. **1**(2): p. 101-6.
173. Gabbriellini, S., et al., *Myofibroblast and elastic and collagen fiber hyperplasia in the bronchial mucosa: a possible basis for the progressive irreversibility of airway obstruction in chronic asthma*. Pathologica, 1994. **86**(2): p. 157-60.
174. Gadek, J.E., et al., *Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema*. J Clin Invest, 1981. **68**(4): p. 889-98.
175. Galli, S.J., J.R. Gordon, and B.K. Wershil, *Cytokine production by mast cells and basophils*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(6): p. 865-72.
176. Garcia-Zepeda, E.A., et al., *Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia*. Nat Med, 1996. **2**(4): p. 449-56.
177. Gardner, H.W., *Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids*. Free Radic Biol Med, 1989. **7**(1): p. 65-86.
178. Gauchat, J.F., et al., *Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils*. Nature, 1993. **365**(6444): p. 340-3.
179. Georas, S.N., et al., *Altered adhesion molecule expression and endothelial cell activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992. **7**(3): p. 261-9.
180. Gershman, N.H., et al., *Comparison of two methods of collecting induced sputum in asthmatic subjects*. Eur Respir J, 1996. **9**(12): p. 2448-53.
181. Gessner, C., et al., *Factors influencing breath condensate volume*. Pneumologie, 2001. **55**(9): p. 414-9.
182. Gibson, P.G., et al., *Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis*. Thorax, 1989. **44**(9): p. 693-9.
183. Gibson, P.G., *Use of induced sputum to examine airway inflammation in childhood asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(5): p. S100-1.
184. Gibson, P.G., et al., *Induced sputum eosinophil cationic protein (ECP) measurement in asthma and chronic obstructive airway disease (COAD)*. Clin Exp Allergy, 1998. **28**(9): p. 1081-8.

185. Gibson, P.G., R.L. Henry, and P. Thomas, *Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide, and breath condensate*. Eur Respir J, 2000. **16**(5): p. 1008-15.
186. Gibson, P.G., J.L. Simpson, and N. Saltos, *Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8*. Chest, 2001. **119**(5): p. 1329-36.
187. Girotti, A.W., *Mechanisms of lipid peroxidation*. J Free Radic Biol Med, 1985. **1**(2): p. 87-95.
188. Gizycki, M.J., et al., *Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(6): p. 664-73.
189. Gleich, G.J., et al., *Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein*. J Immunol, 1979. **123**(6): p. 2925-7.
190. Gleich, G.J., C.R. Adolphson, and K.M. Leiferman, *The biology of the eosinophilic leukocyte*. Annu Rev Med, 1993. **44**: p. 85-101.
191. Godard, P., et al., *Functional assessment of alveolar macrophages: comparison of cells from asthmatics and normal subjects*. J Allergy Clin Immunol, 1982. **70**(2): p. 88-93.
192. Goldring, K. and J.A. Warner, *Cell matrix interactions in asthma*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(1): p. 22-7.
193. Gordon, J.R. and S.J. Galli, *Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses*. J Exp Med, 1991. **174**(1): p. 103-7.
194. Gosset, P., et al., *Increased secretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction*. J Allergy Clin Immunol, 1991. **88**(4): p. 561-71.
195. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(5): p. 662-75.
196. Grebski, E., et al., *Does eosinophil cationic protein in sputum and blood reflect bronchial inflammation and obstruction in allergic asthmatics?* J Investig Allergol Clin Immunol, 1999. **9**(2): p. 82-8.
197. Green, W.F., K. Konnaris, and A.J. Woolcock, *Effect of salbutamol, fenoterol, and sodium cromoglycate on the release of heparin from sensitized human lung fragments challenged with Dermatophagoides pteronyssinus allergen*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **8**(5): p. 518-21.
198. Greenfeder, S., et al., *Tryptase-induced airway microvascular leakage in guinea pigs: involvement of tachykinins and leukotrienes*. Eur J Pharmacol, 2001. **419**(2-3): p. 261-7.
199. Greening, A.P. and D.B. Lowrie, *Extracellular release of hydrogen peroxide by human alveolar macrophages: the relationship to cigarette smoking and lower respiratory tract infections*. Clin Sci (Lond), 1983. **65**(6): p. 661-4.
200. Greiff, L., et al., *Plasma exudation and solute absorption across the airway mucosa*. Clin Physiol, 1993. **13**(3): p. 219-33.
201. Greiff, L., et al., *Effects of formoterol on histamine induced plasma exudation in induced sputum from normal subjects*. Thorax, 1998. **53**(12): p. 1010-3.
202. Gressier, B., et al., *Protective role of glutathione on alpha 1 proteinase inhibitor inactivation by the myeloperoxidase system. Hypothetic study for*

- therapeutic strategy in the management of smokers' emphysema.* Fundam Clin Pharmacol, 1994. **8**(6): p. 518-24.
203. Griffin, M., et al., *Effects of leukotriene D on the airways in asthma.* N Engl J Med, 1983. **308**(8): p. 436-9.
204. Grootendorst, D.C., et al., *Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies.* Clin Exp Allergy, 1997. **27**(7): p. 769-79.
205. Grootendorst, D.C., et al., *Induced sputum in adolescents with severe stable asthma. Safety and the relationship of cell counts and eosinophil cationic protein to clinical severity.* Eur Respir J, 1999. **13**(3): p. 647-53.
206. Gruber, B.L., et al., *Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis.* J Immunol, 1997. **158**(5): p. 2310-7.
207. Guo, C.B., et al., *Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **10**(4): p. 384-90.
208. Halliwell, B. and S. Chirico, *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance.* Am J Clin Nutr, 1993. **57**(5 Suppl): p. 715S-724S; discussion 724S-725S.
209. Halliwell, B., *Antioxidants in human health and disease.* Annu Rev Nutr, 1996. **16**: p. 33-50.
210. Hamulati, Abuduaini, and Abudureyimu, *[Study on the pathogenesis of free radical in nocturnal asthma].* Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 1998. **21**(3): p. 141-3.
211. Hamzaoui, A., et al., *Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbation of asthma.* Mediators Inflamm, 1999. **8**(4-5): p. 237-43.
212. Hargreave, F.E. and R. Leigh, *Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(5 Pt 2): p. S53-7.
213. Harkonen, E., et al., *Modulation of fibronectin and tenascin production in human bronchial epithelial cells by inflammatory cytokines in vitro.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **13**(1): p. 109-15.
214. Harrison, D.J., et al., *Frequency of glutathione S-transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer.* Hum Exp Toxicol, 1997. **16**(7): p. 356-60.
215. Hart, P.H., *Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products.* Immunol Cell Biol, 2001. **79**(2): p. 149-53.
216. Hasselmark, L., et al., *Lowered platelet glutathione peroxidase activity in patients with intrinsic asthma.* Allergy, 1990. **45**(7): p. 523-7.
217. Hasselmark, L., et al., *Selenium supplementation in intrinsic asthma.* Allergy, 1993. **48**(1): p. 30-6.
218. Heffner, J.E. and J.E. Repine, *Pulmonary strategies of antioxidant defense.* Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(2): p. 531-54.
219. Heunks, L.M., et al., *Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 2): p. R1697-704.
220. Higgins, M.W., et al., *An index of risk for obstructive airways disease.* Am Rev Respir Dis, 1982. **125**(2): p. 144-51.

221. Hill, A.T., D. Bayley, and R.A. Stockley, *The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(3): p. 893-8.
222. Hobson, J., J. Wright, and A. Churg, *Histochemical evidence for generation of active oxygen species on the apical surface of cigarette-smoke-exposed tracheal explants*. Am J Pathol, 1991. **139**(3): p. 573-80.
223. Hoidal, J.R., G.D. Beall, and J.E. Repine, *Production of hydroxyl radical by human alveolar macrophages*. Infect Immun, 1979. **26**(3): p. 1088-92.
224. Hoidal, J.R., et al., *Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers*. Am Rev Respir Dis, 1981. **123**(1): p. 85-9.
225. Holgate, S.T., et al., *Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(5): p. 1377-83.
226. Holgate, S.T., *The role of mast cells and basophils in inflammation*. Clin Exp Allergy, 2000. **30 Suppl 1**: p. 28-32.
227. Holz, O., et al., *Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects*. Clin Exp Allergy, 1998. **28**(3): p. 284-92.
228. Holz, O., et al., *Changes in sputum composition between two inductions performed on consecutive days*. Thorax, 1998. **53**(2): p. 83-6.
229. Horvath, I., et al., *Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(4): p. 1042-6.
230. Hoshi, H., et al., *IL-5, IL-8 and GM-CSF immunostaining of sputum cells in bronchial asthma and chronic bronchitis*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(8): p. 720-8.
231. Hoshino, E., et al., *Vitamin E suppresses increased lipid peroxidation in cigarette smokers*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1990. **14**(3): p. 300-5.
232. Hossain, S. and B.E. Heard, *Hyperplasia of bronchial muscle in chronic bronchitis*. J Pathol, 1970. **101**(2): p. 171-84.
233. Hsu, J.Y., et al., *Importance of sputum differential cell counting in the diagnosis of airway diseases*. J Formos Med Assoc, 1997. **96**(5): p. 330-5.
234. Huang, S.L., C.H. Su, and S.C. Chang, *Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(5): p. 1436-9.
235. Hubbard, R.C., et al., *Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase*. J Clin Invest, 1987. **80**(5): p. 1289-95.
236. Humbert, M., et al., *IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(5): p. 1497-504.
237. Humbert, M., et al., *High-affinity IgE receptor (FcepsilonRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(6 Pt 1): p. 1931-7.
238. Humbert, M., et al., *Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and nonatopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)-5,*

- granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, and IL-3*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(1): p. 1-8.
239. in 't Veen, J.C., et al., *Repeatability of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma*. Eur Respir J, 1996. **9**(12): p. 2441-7.
240. Inoue, H., et al., *Nitric oxide synthase inhibitors attenuate ozone-induced airway inflammation in guinea pigs. Possible role of interleukin-8*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(1): p. 249-56.
241. Iredale, M.J., et al., *Non-invasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline*. Clin Exp Allergy, 1994. **24**(10): p. 940-5.
242. Jackson, A.H., et al., *Sputum sol-phase proteins and elastase activity in patients with cystic fibrosis*. Eur J Respir Dis, 1984. **65**(2): p. 114-24.
243. Jacoby, D.B., et al., *Effect of human eosinophil major basic protein on ion transport in dog tracheal epithelium*. Am Rev Respir Dis, 1988. **137**(1): p. 13-6.
244. Jankowska, R., et al., *[The influence of vitamin A on production of oxygen free radicals and activity of granulocyte catalase in patients with chronic bronchitis]*. Pneumonol Alergol Pol, 1994. **62**(11-12): p. 628-33.
245. Janson, C., et al., *Effect of passive smoking on respiratory symptoms, bronchial responsiveness, lung function, and total serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey: a cross-sectional study*. Lancet, 2001. **358**(9299): p. 2103-9.
246. Jarjour, N.N., W.W. Busse, and W.J. Calhoun, *Enhanced production of oxygen radicals in nocturnal asthma*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(4): p. 905-11.
247. Jarjour, N.N., et al., *The immediate and late allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(5): p. 1515-21.
248. Jatakanon, A., et al., *Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(5 Pt 1): p. 1532-9.
249. Jeffery, P.K., et al., *Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(6): p. 1745-53.
250. Jeffery, P.K., *Pathology of asthma*. Br Med Bull, 1992. **48**(1): p. 23-39.
251. Jeffery, P.K., *Differences and similarities between chronic obstructive pulmonary disease and asthma*. Clin Exp Allergy, 1999. **29** Suppl 2: p. 14-26.
252. Jeffery, P.K., *Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. Giles F. Filley Lecture*. Chest, 2000. **117**(5 Suppl 1): p. 251S-60S.
253. Johnson, H.G., et al., *Leukotriene-C4 enhances mucus production from submucosal glands in canine trachea in vivo*. Int J Immunopharmacol, 1983. **5**(5): p. 391-6.
254. Johnson, P.R., et al., *Heparin and PGE2 inhibit DNA synthesis in human airway smooth muscle cells in culture*. Am J Physiol, 1995. **269**(4 Pt 1): p. L514-9.
255. Johnson, P.R., et al., *Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus*. Eur Respir J, 1997. **10**(1): p. 38-43.



256. Joris, I., et al., *The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4. Endothelial contraction.* Am J Pathol, 1987. **126**(1): p. 19-24.
257. Joseph, M., et al., *Involvement of immunoglobulin E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients.* J Clin Invest, 1983. **71**(2): p. 221-30.
258. Joseph, M., et al., *Platelet activation by IgE and aspirin.* Agents Actions Suppl, 1987. **21**: p. 169-77.
259. Kadrabova, J., et al., *Selenium status is decreased in patients with intrinsic asthma.* Biol Trace Elem Res, 1996. **52**(3): p. 241-8.
260. Kamm, R.D. and J.M. Drazen, *Airway hyperresponsiveness and airway wall thickening in asthma. A quantitative approach.* Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(6): p. 1249-50.
261. Kanazawa, H., et al., *Increased production of endogenous nitric oxide in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* Clin Exp Allergy, 1998. **28**(10): p. 1244-50.
262. Kanner, J., J.B. German, and J.E. Kinsella, *Initiation of lipid peroxidation in biological systems.* Crit Rev Food Sci Nutr, 1987. **25**(4): p. 317-64.
263. Kayembe, J.M., et al., *Usefulness of induced sputum analysis in pulmonary diseases.* Acta Clin Belg, 1997. **52**(2): p. 106-11.
264. Keatings, V.M., et al., *Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(2): p. 530-4.
265. Keatings, V.M. and P.J. Barnes, *Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects.* Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(2): p. 449-53.
266. Keatings, V.M., et al., *Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid.* Thorax, 1997. **52**(4): p. 372-4.
267. Kelly, C., et al., *Number and activity of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid in asthma and their relation to airway responsiveness.* Thorax, 1988. **43**(9): p. 684-92.
268. Kelly, F.J., et al., *Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma.* Lancet, 1999. **354**(9177): p. 482-3.
269. Khoury, M.J., et al., *Genetic-environmental interactions in chronic airways obstruction.* Int J Epidemiol, 1986. **15**(1): p. 65-72.
270. Kinney, P.L., et al., *Biomarkers of lung inflammation in recreational joggers exposed to ozone.* Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(5): p. 1430-5.
271. Kips, J.C., et al., *The potential role of tumour necrosis factor alpha in asthma.* Clin Exp Allergy, 1993. **23**(4): p. 247-50.
272. Kivity, S., et al., *A comparison of the inhibitory effect of cromoline and nedocromil Na on histamine release from airway metachromatic cells and from peripheral basophils.* Immunol Lett, 1996. **53**(2-3): p. 147-51.
273. Knox, R.B., et al., *Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution.* Clin Exp Allergy, 1997. **27**(3): p. 246-51.
274. Kobzik, L. and F.J. Schoen, *The lung*, in *Robbins patologic basis of disease*, R.S. Cotran, V. Kumar, and S.L. Robbins, Editors. 1994, W.B.Saunders Company A Division of Harcourt Brace & Company: Philadelphia. p. 673-734.

275. Koenig, J.Q., *Air pollution and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(4 Pt 1): p. 717-22.
276. Kofford, M.W., et al., *Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7127-31.
277. Koh, Y.Y., et al., *Neutrophils recruited to the lungs of humans by segmental antigen challenge display a reduced chemotactic response to leukotriene B<sub>4</sub>*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **8**(5): p. 493-9.
278. Kondo, T., et al., *Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(1): p. 178-82.
279. Koroliuk, M.A., et al., [*A method of determining catalase activity*]. Lab Delo, 1988. **1**: p. 16-9.
280. Krishna, M.T., et al., *Mediators of inflammation in response to air pollution: a focus on ozone and nitrogen dioxide*. J R Coll Physicians Lond, 1996. **30**(1): p. 61-6.
281. Krishna, M.T., et al., *Effects of ozone on epithelium and sensory nerves in the bronchial mucosa of healthy humans*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(3 Pt 1): p. 943-50.
282. Krishnaswamy, G., et al., *The human mast cell: functions in physiology and disease*. Front Biosci, 2001. **6**: p. D1109-27.
283. Kurosawa, M., H. Kobayashi, and M. Nakano, *Cu-Zn superoxide dismutase activities in platelets from stable bronchial asthmatic patients*. Int Arch Allergy Immunol, 1993. **101**(1): p. 61-5.
284. Kuwano, K., et al., *Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(5): p. 1220-5.
285. Kwon, O.J., et al., *Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultured airway epithelial cells*. Immunology, 1994. **81**(3): p. 389-94.
286. Lacoste, J.Y., et al., *Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease*. J Allergy Clin Immunol, 1993. **92**(4): p. 537-48.
287. Laitinen, L.A., et al., *Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma*. Am Rev Respir Dis, 1985. **131**(4): p. 599-606.
288. Laitinen, L.A., M.A. Laitinen, and J.G. Widdicombe, *Dose-related effects of pharmacological mediators on tracheal vascular resistance in dogs*. Br J Pharmacol, 1987. **92**(4): p. 703-9.
289. Laitinen, L.A., et al., *Bronchial biopsy findings in intermittent or "early" asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**(5 Pt 2): p. S3-6; discussion S33-40.
290. Lannan, S., et al., *Effect of cigarette smoke and its condensates on alveolar epithelial cell injury in vitro*. Am J Physiol, 1994. **266**(1 Pt 1): p. L92-100.
291. Lansing, M.W., et al., *Lipid mediators contribute to oxygen-radical-induced airway responses in sheep*. Am Rev Respir Dis, 1991. **144**(6): p. 1291-6.
292. Lee, E., et al., *Reversal of human neutrophil survival by leukotriene B<sub>4</sub> receptor blockade and 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein inhibitors*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(6): p. 2079-85.
293. Leff, A.R., *Inflammatory mediation of airway hyperresponsiveness by peripheral blood granulocytes. The case for the eosinophil*. Chest, 1994. **106**(4): p. 1202-8.

294. Lehr, H.A., et al., *Cigarette smoke elicits leukocyte adhesion to endothelium in hamsters: inhibition by CuZn-SOD*. *Free Radic Biol Med*, 1993. **14**(6): p. 573-81.
295. Lemiere, C., et al., *Diagnosing occupational asthma: use of induced sputum*. *Eur Respir J*, 1999. **13**(3): p. 482-8.
296. Lenfant, C.N.H., Lung, and Blood Institute, Khaltsev, N: World Health Organization, *Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease NHLBI/WHO workshop report*. 2001, National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute.
297. Leslie, K.O., J. Mitchell, and R. Low, *Lung myofibroblasts*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1992. **22**(2): p. 92-8.
298. Leuenberger, P., et al., *Passive smoking exposure in adults and chronic respiratory symptoms (SAPALDIA Study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults, SAPALDIA Team*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **150**(5 Pt 1): p. 1222-8.
299. Leynaert, B., et al., *Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European Community Respiratory Health Survey*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **104**(2 Pt 1): p. 301-4.
300. Li, X.Y., et al., *An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **149**(6): p. 1518-25.
301. Liepa, I., *Biometrija*. 1974, Rīga: Zvaigzne. 339.
302. Lilly, C.M., et al., *Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(7): p. 1767-73.
303. Lim, S., et al., *Expression of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and asthmatic airways: effect of inhaled corticosteroids*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **162**(5): p. 1912-8.
304. Linden, M., et al., *Glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from smokers is related to humoral markers of inflammatory cell activity*. *Inflammation*, 1989. **13**(6): p. 651-8.
305. Linden, M., et al., *Airway inflammation in smokers with nonobstructive and obstructive chronic bronchitis*. *Am Rev Respir Dis*, 1993. **148**(5): p. 1226-32.
306. Liu, A.N., et al., *Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor-alpha: relative insensitivity to Fas ligand*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **20**(5): p. 849-58.
307. Liu, M.C., et al., *Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes*. *Am Rev Respir Dis*, 1991. **144**(1): p. 51-8.
308. Lopez, A.F., et al., *Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function*. *J Exp Med*, 1988. **167**(1): p. 219-24.
309. Louis, R., et al., *The relationship between airways inflammation and asthma severity*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **161**(1): p. 9-16.
310. Louis, R.E., et al., *Evidence of mast-cell activation in a subset of patients with eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease*. *Eur Respir J*, 2002. **20**(2): p. 325-31.

311. Ludwig, P.W. and J.R. Hoidal, *Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers*. Am Rev Respir Dis, 1982. **126**(6): p. 977-80.
312. Lumsden, A.B., A. McLean, and D. Lamb, *Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers*. Thorax, 1984. **39**(11): p. 844-9.
313. Lungarella, G., et al., *Identification of elastase in human eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization*. Arch Biochem Biophys, 1992. **292**(1): p. 128-35.
314. Mabuchi, K., et al., *Differential effects of platelet-activating factor on superoxide anion production in human eosinophils and neutrophils*. Biochem Int, 1992. **26**(6): p. 1105-13.
315. MacPherson, J.C., et al., *Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5763-72.
316. Maestrelli, P., et al., *Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(6 Pt 1): p. 1926-31.
317. Maestrelli, P., et al., *Remodeling in response to infection and injury. Airway inflammation and hypersecretion of mucus in smoking subjects with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 2): p. S76-80.
318. Maier, K.L., L. Leuschel, and U. Costabel, *Increased oxidized methionine residues in BAL fluid proteins in acute or chronic bronchitis*. Eur Respir J, 1992. **5**(6): p. 651-8.
319. Malech, H.L. and J.I. Gallin, *Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases*. N Engl J Med, 1987. **317**(11): p. 687-94.
320. Malmgren, R., et al., *Lowered glutathione-peroxidase activity in asthmatic patients with food and aspirin intolerance*. Allergy, 1986. **41**(1): p. 43-5.
321. Mangione, S., et al., *Erythrocytes prevent inactivation of alpha 1-antitrypsin by cigarette smoke*. Eur Respir J, 1991. **4**(1): p. 26-30.
322. Marom, Z., et al., *Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro*. Am Rev Respir Dis, 1982. **126**(3): p. 449-51.
323. Masubuchi, T., et al., *Smoke extract stimulates lung epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity*. Am J Pathol, 1998. **153**(6): p. 1903-12.
324. Mautino, G., et al., *Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(5): p. 583-91.
325. Maziak, W., et al., *Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(3 Pt 1): p. 998-1002.
326. McCain, R.W., et al., *Leukotriene B4 stimulates human polymorphonuclear leukocytes to synthesize and release interleukin-8 in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **10**(6): p. 651-7.
327. McCusker, K. and J. Hoidal, *Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters*. Am Rev Respir Dis, 1990. **141**(3): p. 678-82.
328. Meininger, C.J. and B.R. Zetter, *Mast cells and angiogenesis*. Semin Cancer Biol, 1992. **3**(2): p. 73-9.

329. Menard, G. and E.Y. Bissonnette, *Priming of alveolar macrophages by leukotriene D(4): potentiation of inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(4): p. 572-7.
330. Mendis, A.H., T.J. Venaille, and B.W. Robinson, *Study of human epithelial cell detachment and damage: effects of proteases and oxidants*. Immunol Cell Biol, 1990. **68**(Pt 2): p. 95-105.
331. Metzger, W.J., et al., *Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. Description of the model and local airway inflammation*. Am Rev Respir Dis, 1987. **135**(2): p. 433-40.
332. Mio, T., et al., *Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(5): p. 1770-6.
333. Misawa, M. and H. Arai, *Airway inflammatory effect of hydrogen peroxide in guinea pigs*. J Toxicol Environ Health, 1993. **38**(4): p. 435-48.
334. Misawa, M. and H. Arai, *Airway inflammation induced by xanthine/xanthine oxidase in guinea pigs*. Agents Actions, 1993. **38**(1-2): p. 19-26.
335. Misso, N.L., et al., *Reduced platelet glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration in atopic asthmatic patients*. Clin Exp Allergy, 1996. **26**(7): p. 838-47.
336. Misso, N.L., et al., *Glutathione peroxidase activity and mRNA expression in eosinophils and neutrophils of asthmatic and non-asthmatic subjects*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(1): p. 124-30.
337. Montefort, S., et al., *Ciliated cell damage in the bronchial epithelium of asthmatics and non-asthmatics*. Clin Exp Allergy, 1993. **23**(3): p. 185-9.
338. Montefort, S., et al., *Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways*. J Clin Invest, 1994. **93**(4): p. 1411-21.
339. Morrison, D., et al., *Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(2): p. 473-9.
340. Morrison, J.F., et al., *Platelet activation in nocturnal asthma*. Thorax, 1991. **46**(3): p. 197-200.
341. Mueller, R., et al., *Different cytokine patterns in bronchial biopsies in asthma and chronic bronchitis*. Respir Med, 1996. **90**(2): p. 79-85.
342. Muijsers, R.B., et al., *Apocynin and 1400 W prevents airway hyperresponsiveness during allergic reactions in mice*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(2): p. 434-40.
343. Mukherjee, S., et al., *The effect of mainstream and sidestream cigarette smoke exposure on oxygen defense mechanisms of guinea pig erythrocytes*. J Biochem Toxicol, 1993. **8**(3): p. 119-25.
344. Muller-Suur, C., et al., *Increased number of activated lymphocytes in human lung following swine dust inhalation*. Eur Respir J, 1997. **10**(2): p. 376-80.
345. Murlas, C.G. and J.H. Roun, *Sequence of pathologic changes in the airway mucosa of guinea pigs during ozone-induced bronchial hyperreactivity*. Am Rev Respir Dis, 1985. **131**(3): p. 314-20.
346. Mylonas, C. and D. Kouretas, *Lipid peroxidation and tissue damage*. In Vivo, 1999. **13**(3): p. 295-309.
347. Nagata, M., J.B. Sedgwick, and W.W. Busse, *Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eosinophil and*

- neutrophil superoxide anion generation.* J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4948-54.
348. Nagata, Y., et al., *Secretion of hyaluronic acid from synovial fibroblasts is enhanced by histamine: a newly observed metabolic effect of histamine.* J Lab Clin Med, 1992. **120**(5): p. 707-12.
349. Nagy, L., et al., *Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products.* Clin Exp Immunol, 1982. **47**(3): p. 541-7.
350. Nakamura, Y., et al., *Bronchial epithelial cells regulate fibroblast proliferation.* Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 1): p. L377-87.
351. Nakashima, H., et al., *Receptor-mediated O<sub>2</sub>- release by alveolar macrophages and peripheral blood monocytes from smokers and nonsmokers. Priming and triggering effects of monomeric IgG, concanavalin A, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, phorbol myristate acetate, and cytochalasin D.* Am Rev Respir Dis, 1987. **136**(2): p. 310-5.
352. Nasser, S.M., et al., *Inflammatory cell populations in bronchial biopsies from aspirin-sensitive asthmatic subjects.* Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(1): p. 90-6.
353. Neeley, S.P., et al., *Selective regulation of expression of surface adhesion molecules Mac-1, L-selectin, and VLA-4 on human eosinophils and neutrophils.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1993. **8**(6): p. 633-9.
354. Nel, A.E., et al., *Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system.* J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(4 Pt 1): p. 539-54.
355. Newson, E.J., et al., *Effects of short-term exposure to 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in sputum, exhaled nitric oxide, and lung function in subjects with mild atopic asthma.* J Occup Environ Med, 2000. **42**(3): p. 270-7.
356. Nishikawa, M., [Cigarette smoke-induced acute airway impairment]. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi, 2000. **38**(5): p. 347-53.
357. Nocker, R.E., et al., *A double-blind study on the effect of inhaled corticosteroids on plasma protein exudation in asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(5 Pt 1): p. 1499-505.
358. Nomura, H., et al., *Histamine stimulates alveolar macrophages to release neutrophil and monocyte chemotactic activity.* J Lab Clin Med, 2001. **138**(4): p. 226-35.
359. Norn, S., et al., *Histamine release induced by bacteria. A new mechanism in asthma?* Agents Actions, 1987. **20**(1-2): p. 29-34.
360. Novak, Z., et al., *Examination of the role of oxygen free radicals in bronchial asthma in childhood.* Clin Chim Acta, 1991. **201**(3): p. 247-51.
361. Ochensberger, B., et al., *Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and -independent activation.* Blood, 1996. **88**(8): p. 3028-37.
362. Ohkawara, Y., et al., *In situ expression of the cell adhesion molecules in bronchial tissues from asthmatics with air flow limitation: in vivo evidence of VCAM-1/VLA-4 interaction in selective eosinophil infiltration.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(1): p. 4-12.
363. Ohnishi, T., et al., *IL-5 is the predominant eosinophil-active cytokine in the antigen-induced pulmonary late-phase reaction.* Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(4): p. 901-7.

364. Ohno, I., et al., *Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor beta 1 gene (TGF beta 1)*. J Clin Invest, 1992. **89**(5): p. 1662-8.
365. Ohno, I., et al., *Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(3): p. 212-9.
366. Olivenstein, R., et al., *IL-4 and IL-5 mRNA expression in induced sputum of asthmatic subjects: comparison with bronchial wash*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **103**(2 Pt 1): p. 238-45.
367. Ollerenshaw, S.L. and A.J. Woolcock, *Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitation*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(4 Pt 1): p. 922-7.
368. Ordonez, C.L., et al., *Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(2): p. 517-23.
369. O'Shaughnessy, T.C., et al., *Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(3): p. 852-7.
370. Page, C., *The role of platelets in allergic disease*. Clin Exp Allergy, 1990. **20**(4): p. 339-40.
371. Parameswaran, K., et al., *Sputum cell counts and exhaled nitric oxide in patients with gastroesophageal reflux, and cough or asthma*. Can Respir J, 2001. **8**(4): p. 239-44.
372. Pardos Martinez, C., et al., *[Risk factors for asthma, allergy and bronchial hyperresponsiveness in children aged 6-8 years old]*. An Esp Pediatr, 2001. **55**(3): p. 205-12.
373. Paredi, P., et al., *Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **162**(2 Pt 1): p. 369-73.
374. Park, H.S., et al., *Neutrophil infiltration and release of IL-8 in airway mucosa from subjects with grain dust-induced occupational asthma*. Clin Exp Allergy, 1998. **28**(6): p. 724-30.
375. Pavord, I.D., et al., *Induced sputum eicosanoid concentrations in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(6): p. 1905-9.
376. Pedersen, B., et al., *Eosinophil and neutrophil activity in asthma in a one-year trial with inhaled budesonide. The impact of smoking*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(5): p. 1519-29.
377. Peinado, V.I., et al., *Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(5 Pt 1): p. 1605-11.
378. Peleman, R.A., et al., *The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 1999. **13**(4): p. 839-43.
379. Perez-Padilla, R., et al., *Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican women. A case-control study*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(3 Pt 1): p. 701-6.
380. Pertovaara, L., et al., *Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(9): p. 6271-4.

381. Pesci, A., et al., *Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 1998. **12**(2): p. 380-6.
382. Pesci, A., et al., *Neutrophils infiltrating bronchial epithelium in chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Med, 1998. **92**(6): p. 863-70.
383. Petrone, W.F., et al., *Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(2): p. 1159-63.
384. Petruzzelli, S., et al., *Pulmonary lipid peroxidation in cigarette smokers and lung cancer patients*. Chest, 1990. **98**(4): p. 930-5.
385. Phan, S.H., et al., *Mechanism of neutrophil-induced xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase conversion in endothelial cells: evidence of a role for elastase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992. **6**(3): p. 270-8.
386. Picado, C., et al., *Dietary micronutrients/antioxidants and their relationship with bronchial asthma severity*. Allergy, 2001. **56**(1): p. 43-9.
387. Pin, I., et al., *Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma*. Thorax, 1992. **47**(1): p. 25-9.
388. Pinamonti, S., et al., *Xanthine oxidase activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Free Radic Biol Med, 1996. **21**(2): p. 147-55.
389. Pinamonti, S., et al., *Detection of xanthine oxidase activity products by EPR and HPLC in bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Free Radic Biol Med, 1998. **25**(7): p. 771-9.
390. Pizzichini, E., et al., *Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(2 Pt 1): p. 308-17.
391. Pizzichini, E., et al., *Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination*. Eur Respir J, 1996. **9**(6): p. 1174-80.
392. Pizzichini, E., et al., *Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared*. Eur Respir J, 1998. **11**(4): p. 828-34.
393. Pizzichini, M.M., et al., *Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(5): p. 1501-8.
394. Pizzichini, M.M., et al., *Asthma and natural colds. Inflammatory indices in induced sputum: a feasibility study*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(4): p. 1178-84.
395. Plaza, V., et al., *In vitro release of arachidonic acid metabolites, glutathione peroxidase, and oxygen-free radicals from platelets of asthmatic patients with and without aspirin intolerance*. Thorax, 1995. **50**(5): p. 490-6.
396. Postma, D.S., et al., *Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic air-flow obstruction*. Am Rev Respir Dis, 1988. **137**(1): p. 57-61.
397. Poston, R.N., et al., *Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(4 Pt 1): p. 918-21.
398. Poulter, L.W., C. Power, and C. Burke, *The relationship between bronchial immunopathology and hyperresponsiveness in asthma*. Eur Respir J, 1990. **3**(7): p. 792-9.



399. Poulter, L.W., et al., *Immunological/physiological relationships in asthma: potential regulation by lung macrophages*. Immunol Today, 1994. **15**(6): p. 258-61.
400. Powell, C.V., et al., *Antioxidant status in asthma*. Pediatr Pulmonol, 1994. **18**(1): p. 34-8.
401. Pryor, W.A., D.G. Prier, and D.F. Church, *Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar*. Environ Health Perspect, 1983. **47**: p. 345-55.
402. Pryor, W.A. and K. Stone, *Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **686**: p. 12-27; discussion 27-8.
403. Rabe, K.F., et al., *Contraction of human bronchial smooth muscle caused by activated human eosinophils*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 1): p. L326-34.
404. Rahman, I. and W. MacNee, *Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease*. Thorax, 1996. **51**(4): p. 348-50.
405. Rahman, I. and W. MacNee, *Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases*. Free Radic Biol Med, 1996. **21**(5): p. 669-81.
406. Rahman, I., et al., *Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(4 Pt 1): p. 1055-60.
407. Rahman, I., et al., *Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells*. FEBS Lett, 1996. **396**(1): p. 21-5.
408. Rahman, I. and W. MacNee, *Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. L1067-88.
409. Rahman, I. and W. MacNee, *Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation*. Eur Respir J, 2000. **16**(3): p. 534-54.
410. Rahman, I., et al., *Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease?* Thorax, 2000. **55**(3): p. 189-93.
411. Ramshaw, H.S., et al., *New approaches in the treatment of asthma*. Immunol Cell Biol, 2001. **79**(2): p. 154-9.
412. Rennard, S.I., et al., *Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution*. J Appl Physiol, 1986. **60**(2): p. 532-8.
413. Rennard, S.I., et al., *Evaluation of subclinical respiratory tract inflammation in heavy smokers who switch to a cigarette-like nicotine delivery device that primarily heats tobacco*. Nicotine Tob Res, 2002. **4**(4): p. 467-76.
414. Repine, J.E., *Interleukin-1-mediated acute lung injury and tolerance to oxidative injury*. Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 10**: p. 75-8.
415. Repine, J.E., A. Bast, and I. Lankhorst, *Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease*. Oxidative Stress Study Group. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 341-57.
416. Richman-Eisenstat, J.B., et al., *Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases*. Am J Physiol, 1993. **264**(4 Pt 1): p. L413-8.
417. Riise, G.C., S. Larsson, and B.A. Andersson, *A bronchoscopic brush biopsy study of large airway mucosal pathology in smokers with chronic bronchitis and in healthy nonsmokers*. Eur Respir J, 1992. **5**(4): p. 382-6.

418. Robinson, D., et al., *Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma.* J Allergy Clin Immunol, 1993. **92**(2): p. 313-24.
419. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma.* N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 298-304.
420. Roth, M.D., et al., *Airway inflammation in young marijuana and tobacco smokers.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(3 Pt 1): p. 928-37.
421. Ruoss, S.J., T. Hartmann, and G.H. Caughey, *Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts.* J Clin Invest, 1991. **88**(2): p. 493-9.
422. Rushmore, T.H., M.R. Morton, and C.B. Pickett, *The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity.* J Biol Chem, 1991. **266**(18): p. 11632-9.
423. Rusznak, C., et al., *Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1beta and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(4): p. 530-6.
424. Rutgers, S.R., et al., *Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke.* Thorax, 2000. **55**(1): p. 12-8.
425. Rutgers, S.R., et al., *Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD.* Eur Respir J, 2000. **15**(1): p. 109-15.
426. Saetta, M., et al., *Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma.* Am Rev Respir Dis, 1991. **143**(1): p. 138-43.
427. Saetta, M., et al., *Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis.* Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(2): p. 301-6.
428. Saetta, M., et al., *Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations.* Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(6 Pt 1): p. 1646-52.
429. Saetta, M., et al., *Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis.* Clin Exp Allergy, 1996. **26**(7): p. 766-74.
430. Saetta, M., et al., *CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(3 Pt 1): p. 822-6.
431. Saetta, M., et al., *CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(2): p. 711-7.
432. Saetta, M., et al., *Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation.* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(3 Pt 1): p. 1016-21.
433. Sahin, U., et al., *Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in chronic obstructive pulmonary disease exacerbation: prognostic value of malondialdehyde.* J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2001. **12**(1): p. 59-68.
434. Sala, A. and G. Folco, *Neutrophils, endothelial cells, and cysteinyl leukotrienes: a new approach to neutrophil-dependent inflammation?* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(5): p. 1003-6.

435. Saleh, D., et al., *Increased formation of the potent oxidant peroxyne nitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid*. *Faseb J*, 1998. **12**(11): p. 929-37.
436. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia, *Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells*. *Science*, 1997. **277**(5334): p. 2005-7.
437. Salvi, S., et al., *Interleukin-5 production by human airway epithelial cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **20**(5): p. 984-91.
438. Salvi, S.S., A. Frew, and S. Holgate, *Is diesel exhaust a cause for increasing allergies?* *Clin Exp Allergy*, 1999. **29**(1): p. 4-8.
439. Samet, J.M., M.C. Marbury, and J.D. Spengler, *Health effects and sources of indoor air pollution. Part I*. *Am Rev Respir Dis*, 1987. **136**(6): p. 1486-508.
440. Sampson, A.P., *The role of eosinophils and neutrophils in inflammation*. *Clin Exp Allergy*, 2000. **30 Suppl 1**: p. 22-7.
441. Sanguinetti, C.M., *Oxidant/antioxidant imbalance: role in the pathogenesis of COPD*. *Respiration*, 1992. **59**(Suppl 1): p. 20-3.
442. Schaberg, T., et al., *Superoxide anion release induced by platelet-activating factor is increased in human alveolar macrophages from smokers*. *Eur Respir J*, 1992. **5**(4): p. 387-93.
443. Schaberg, T., et al., *Subpopulations of alveolar macrophages in smokers and nonsmokers: relation to the expression of CD11/CD18 molecules and superoxide anion production*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. **151**(5): p. 1551-8.
444. Schellenberg, D., et al., *Vitamin D binding protein variants and the risk of COPD*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(3 Pt 1): p. 957-61.
445. Schmekel, B., et al., *Kinetic retrieval of eosinophil cationic protein, hyaluronan, secretory IgA, albumin, and urea during BAL in healthy subjects*. *Chest*, 1995. **108**(1): p. 62-7.
446. Schwartz, L.B., *Cellular inflammation in asthma: neutral proteases of mast cells*. *Am Rev Respir Dis*, 1992. **145**(2 Pt 2): p. S18-21.
447. Sedgwick, J.B., et al., *Stimulus-dependent differences in superoxide anion generation by normal human eosinophils and neutrophils*. *J Allergy Clin Immunol*, 1988. **81**(5 Pt 1): p. 876-83.
448. Sedgwick, J.B., et al., *Effect of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor on in vitro eosinophil function: comparison with airway eosinophils*. *J Allergy Clin Immunol*, 1995. **96**(3): p. 375-85.
449. Semenkova, G.N., et al., *[Chemiluminescence in the peroxidase oxidation of luminol with hydrogen peroxide in various media]*. *Lab Delo*, 1991. **11**: p. 13-5.
450. Serhan, C.N., *Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are endogenous components of antiinflammation: emergence of the counterregulatory side*. *Arch Immunol Ther Exp*, 2001. **49**(3): p. 177-88.
451. Shanmugasundaram, K.R., S.S. Kumar, and S. Rajajee, *Excessive free radical generation in the blood of children suffering from asthma*. *Clin Chim Acta*, 2001. **305**(1-2): p. 107-14.
452. Shapiro, S.D., *Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **150**(6 Pt 2): p. S160-4.
453. Shaw, R.J., *The role of lung macrophages at the interface between chronic inflammation and fibrosis*. *Respir Med*, 1991. **85**(4): p. 267-73.

454. Sheppard, M.N. and N.K. Harrison, *New perspectives on basic mechanisms in lung disease. I. Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis*. Thorax, 1992. **47**(12): p. 1064-74.
455. Sherrill, D.L., M.D. Lebowitz, and B. Burrows, *Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease*. Clin Chest Med, 1990. **11**(3): p. 375-87.
456. Shimura, S., et al., *Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma*. Eur Respir J, 1996. **9**(7): p. 1395-401.
457. Shimura, S., *[Bronchoalveolar lavage in diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease]*. Nippon Rinsho, 1999. **57**(9): p. 2005-11.
458. Shukla, A., et al., *Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(2): p. 182-7.
459. Siafakas, N.M., et al., *Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force*. Eur Respir J, 1995. **8**(8): p. 1398-420.
460. Siafakas, N.M., et al., *Microsatellite DNA instability in COPD*. Chest, 1999. **116**(1): p. 47-51.
461. Sietsema, K., et al., *Solute concentrations of bronchoalveolar fluids (Abstract)*. FASEB J, 1986. **5**: p. A1139.
462. Silverman, E.K. and F.E. Speizer, *Risk factors for the development of chronic obstructive pulmonary disease*. Med Clin North Am, 1996. **80**(3): p. 501-22.
463. Siroux, V., et al., *Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma*. Eur Respir J, 2000. **15**(3): p. 470-7.
464. Sladek, K., et al., *Eicosanoids in bronchoalveolar lavage fluid of aspirin-intolerant patients with asthma after aspirin challenge*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(4 Pt 1): p. 940-6.
465. Smith, C.A. and D.J. Harrison, *Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema*. Lancet, 1997. **350**(9078): p. 630-3.
466. Smith, L.J., M. Houston, and J. Anderson, *Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(6 Pt 1): p. 1461-4.
467. Smith, L.J., et al., *Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(7): p. 1301-7.
468. Sohn, H.O., et al., *Effect of subchronic administration of antioxidants against cigarette smoke exposure in rats*. Arch Toxicol, 1993. **67**(10): p. 667-73.
469. Spanevello, A., et al., *Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(10): p. 1138-44.
470. Sperber, K., et al., *In vivo detection of a novel macrophage-derived protein involved in the regulation of mucus-like glycoconjugate secretion*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(6): p. 1589-97.
471. Sperber, K., et al., *Detection of a novel macrophage-derived mucus secretagogue (MMS-68) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1995. **95**(4): p. 868-76.
472. Spurzem, J.R., et al., *Chronic inflammation is associated with an increased proportion of goblet cells recovered by bronchial lavage*. Chest, 1991. **100**(2): p. 389-93.

473. Stockley, R.A., *New approaches to the management of COPD*. Chest, 2000. **117**(2 Suppl): p. 58S-62S.
474. Stockley, R.A., *Neutrophils and the pathogenesis of COPD*. Chest, 2002. **121**(5 Suppl): p. 151S-155S.
475. Stone, J., et al., *Reduced selenium status of patients with asthma*. Clin Sci (Colch), 1989. **77**(5): p. 495-500.
476. Stone, P.J., et al., *Elastin and collagen degradation products in urine of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(4): p. 952-9.
477. Sunderkotter, C., et al., *Macrophages and angiogenesis*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(3): p. 410-22.
478. Sur, S., et al., *Eosinophilic inflammation is associated with elevation of interleukin-5 in the airways of patients with spontaneous symptomatic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1995. **96**(5 Pt 1): p. 661-8.
479. Suzuki, R., et al., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in sputum from patients with bronchial asthma*. J Asthma, 2001. **38**(6): p. 477-84.
480. Swan, G.E., et al., *Relationship of cytomorphology to spirometric findings in cigarette smokers*. Acta Cytol, 1994. **38**(4): p. 547-53.
481. Tager, I.B., et al., *The natural history of forced expiratory volumes. Effect of cigarette smoking and respiratory symptoms*. Am Rev Respir Dis, 1988. **138**(4): p. 837-49.
482. Taha, R.A., et al., *Increased expression of the chemoattractant cytokines eotaxin, monocyte chemoattractant protein-4, and interleukin-16 in induced sputum in asthmatic patients*. Chest, 2001. **120**(2): p. 595-601.
483. Taivans, I., et al., *A simple method of bronchoprovocation using a valved holding chamber*. J Aerosol Med, 2004. **17**(3): p. 270-7.
484. Takafuji, S., et al., *Eosinophil degranulation in the presence of bronchial epithelial cells. Effect of cytokines and role of adhesion*. J Immunol, 1996. **156**(10): p. 3980-5.
485. Tamaoki, J., et al., *Validity and safety of sputum induction by inhaled uridine 5'-triphosphate*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(3): p. 378-81.
486. Tao, X., et al., *Priority among air pollution factors for preventing chronic obstructive pulmonary disease in Shanghai*. Sci Total Environ, 1992. **127**(1-2): p. 57-67.
487. Tatsuhito, T.O., et al., *Chemiluminescence of Whole Blood. A Simple and Rapid Method of the Estimation of Phagocytic Function of Granulocytes and Opsonic Activity in Whole Blood*. Clin Immun Immunopath, 1983. **26**: p. 66-75.
488. Taylor, A.E. and K.A. Gaar, Jr., *Estimation of equivalent pore radii of pulmonary capillary and alveolar membranes*. Am J Physiol, 1970. **218**(4): p. 1133-40.
489. Taylor, I.K., et al., *Platelet-derived growth factor-beta mRNA in human alveolar macrophages in vivo in asthma*. Eur Respir J, 1994. **7**(11): p. 1966-72.
490. Taylor, J.C., R. Madison, and D. Kosinska, *Is antioxidant deficiency related to chronic obstructive pulmonary disease?* Am Rev Respir Dis, 1986. **134**(2): p. 285-9.
491. Taytard, A., et al., *Platelet kinetics in stable atopic asthmatic patients*. Am Rev Respir Dis, 1986. **134**(5): p. 983-5.

492. Tekin, D., et al., *The antioxidative defense in asthma*. J Asthma, 2000. **37**(1): p. 59-63.
493. Teran, L.M., et al., *Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways*. J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1806-12.
494. Thivierge, M., et al., *IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5221-6.
495. Tho, L.L. and J.K. Candlish, *Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes as indices of oxygen loading in disease: a survey of one hundred cases*. Biochem Med Metab Biol, 1987. **38**(1): p. 74-80.
496. Thomas, P.S., D.H. Yates, and P.J. Barnes, *Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(1): p. 76-80.
497. Thompson, A.B., et al., *Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(6): p. 1527-37.
498. Thompson, A.B., et al., *Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smoking*. J Lab Clin Med, 1991. **117**(6): p. 493-9.
499. Thompson, H.L., et al., *Murine mast cells synthesize basement membrane components. A potential role in early fibrosis*. J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 619-23.
500. Tonnel, A.B., et al., *Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test*. Lancet, 1983. **1**(8339): p. 1406-8.
501. Tos, M. and K. Moller, *Goblet-cell density in human bronchus in chronic bronchitis*. Arch Otolaryngol, 1983. **109**(10): p. 673-6.
502. Toth, K.M., et al., *Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers*. Am Rev Respir Dis, 1986. **134**(2): p. 281-4.
503. Totti, N., 3rd, et al., *Nicotine is chemotactic for neutrophils and enhances neutrophil responsiveness to chemotactic peptides*. Science, 1984. **223**(4632): p. 169-71.
504. Triggiani, M., et al., *Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(1): p. 94-100.
505. Truong-Tran, A.Q., R.E. Ruffin, and P.D. Zalewski, *Visualization of labile zinc and its role in apoptosis of primary airway epithelial cells and cell lines*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(6): p. L1172-83.
506. Tucker, A., et al., *Histamine H1- and H2-receptors in pulmonary and systemic vasculature of the dog*. Am J Physiol, 1975. **229**(4): p. 1008-13.
507. Turato, G., et al., *Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(4 Pt 1): p. 1262-7.
508. Tyrell, D.J., S. Kilfeather, and C.P. Page, *Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant*. Trends Pharmacol Sci, 1995. **16**(6): p. 198-204.
509. Vachier, I., et al., *Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthmatic patients*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(5 Pt 1): p. 1161-6.

510. Vachier, I., et al., *Effects of glucocorticoids on endogenous and transcellular metabolism of eicosanoids in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(5): p. 824-31.
511. Vagaggini, B., et al., *Effect of short-term NO<sub>2</sub> exposure on induced sputum in normal, asthmatic and COPD subjects*. Eur Respir J, 1996. **9**(9): p. 1852-7.
512. van Dalen, C.J. and A.J. Kettle, *Substrates and products of eosinophil peroxidase*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 233-9.
513. Van Vyve, T., et al., *Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects*. J Allergy Clin Immunol, 1995. **95**(1 Pt 1): p. 60-8.
514. Vignola, A.M., et al., *Release of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases*. Clin Exp Immunol, 1996. **106**(1): p. 114-9.
515. Vignola, A.M., et al., *Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 591-9.
516. Vignola, A.M., et al., *Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(2): p. 505-11.
517. Vignola, A.M., et al., *Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(6): p. 1945-50.
518. Vlasova, S.N., E.I. Shabunina, and I.A. Pereslegina, [*The activity of the glutathione-dependent enzymes of erythrocytes in chronic liver diseases in children*]. Lab Delo, 1990. **8**: p. 19-22.
519. von Mutius, E., *The environmental predictors of allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(1 Pt 1): p. 9-19.
520. Vural, H. and K. Uzun, *Serum and red blood cell antioxidant status in patients with bronchial asthma*. Can Respir J, 2000. **7**(6): p. 476-80.
521. Walker, C., et al., *T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma*. J Immunol, 1991. **146**(6): p. 1829-35.
522. Walker, C., et al., *Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(1): p. 109-15.
523. Wallaert, B., et al., *Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by alveolar inflammatory cells from smoking patients with or without emphysema*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(6 Pt 1): p. 1537-43.
524. Wallerath, T., et al., *Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets*. Thromb Haemost, 1997. **77**(1): p. 163-7.
525. Walz, T.M., et al., *Production of transforming growth factor alpha by normal human blood eosinophils*. Leukemia, 1993. **7**(10): p. 1531-7.
526. Walz, T.M., et al., *Transforming growth factor alpha expression in normal human blood eosinophils: differential regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3*. Leukemia, 1994. **8**(4): p. 612-9.
527. Ward, C., et al., *Bronchoalveolar lavage fluid urea as a measure of pulmonary permeability in healthy smokers*. Eur Respir J, 2000. **15**(2): p. 285-90.

528. Ward, R., et al., *Between-observer repeatability of sputum differential cell counts. Influence of cell viability and squamous cell contamination.* Clin Exp Allergy, 1999. **29**(2): p. 248-52.
529. Weiss, J.W., et al., *Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in humans.* Science, 1982. **216**(4542): p. 196-8.
530. Weitberg, A.B. and D. Corvese, *Oxygen radicals potentiate the genetic toxicity of tobacco-specific nitrosamines.* Clin Genet, 1993. **43**(2): p. 88-91.
531. Weitzman, M., et al., *Maternal smoking and childhood asthma.* Pediatrics, 1990. **85**(4): p. 505-11.
532. Weller, P.F., *The immunobiology of eosinophils.* N Engl J Med, 1991. **324**(16): p. 1110-8.
533. Wenzel, S.E., et al., *Spectrum of prostanoid release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control groups. An alteration in the ratio of bronchoconstrictive to bronchoprotective mediators.* Am Rev Respir Dis, 1989. **139**(2): p. 450-7.
534. Wesselius, L.J., M.E. Nelson, and B.S. Skikne, *Increased release of ferritin and iron by iron-loaded alveolar macrophages in cigarette smokers.* Am J Respir Crit Care Med, 1994. **150**(3): p. 690-5.
535. Williams, J., et al., *Regulation of low affinity IgE receptor (CD23) expression on mononuclear phagocytes in normal and asthmatic subjects.* J Immunol, 1992. **149**(8): p. 2823-9.
536. Wood, L.G., et al., *Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma.* Lipids, 2000. **35**(9): p. 967-74.
537. Wright, J.L. and A. Churg, *Smoking cessation decreases the number of metaplastic secretory cells in the small airways of the Guinea pig.* Inhal Toxicol, 2002. **14**(11): p. 1153-9.
538. Wu, W., Y. Chen, and S.L. Hazen, *Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders.* J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25933-44.
539. Wurzel, H., et al., *Oxidative damage and antioxidant status in the lungs and bronchoalveolar lavage fluid of rats exposed chronically to cigarette smoke.* J Biochem Toxicol, 1995. **10**(1): p. 11-7.
540. Yamamoto, C., et al., *Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8.* Chest, 1997. **112**(2): p. 505-10.
541. Yanagihara, Y., et al., *Cultured basophils but not cultured mast cells induce human IgE synthesis in B cells after immunologic stimulation.* Clin Exp Immunol, 1998. **111**(1): p. 136-43.
542. Yao, P.M., et al., *Expression of matrix metalloproteinase gelatinases A and B by cultured epithelial cells from human bronchial explants.* J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15580-9.
543. Yates, D.H., *Role of exhaled nitric oxide in asthma.* Immunol Cell Biol, 2001. **79**(2): p. 178-90.
544. Ying, S., et al., *Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(5): p. 477-87.
545. Ying, S., et al., *Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies*



- obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics.* J Immunol, 1997. **158**(7): p. 3539-44.
546. York, G.K., et al., *Stimulation by cigarette smoke of glutathione peroxidase system enzyme activities in rat lung.* Arch Environ Health, 1976. **31**(6): p. 286-90.
547. Young, L.S., et al., *CD40 and epithelial cells: across the great divide.* Immunol Today, 1998. **19**(11): p. 502-6.
548. Yu, B., Q. He, and Z. Gao, [*The role of glucocorticosteroid and theophylline in asthmatic inflammation of murine model and the inhibition in NO production in lung*]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 1998. **21**(11): p. 664-7.
549. Zang, L.Y., K. Stone, and W.A. Pryor, *Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance.* Free Radic Biol Med, 1995. **19**(2): p. 161-7.
550. Zar, J.H., *Biostatistical analysis.* 4th ed. Library of Congress Cataloging in Publication Data, ed. S.L. Snively. 1999, New Jersey 07458 USA: Prentice-Hall, Inc. Simon&Schuster/A Viacom Company. 663.
551. Zeibecoglou, K., et al., *Expression of eotaxin in induced sputum of atopic and nonatopic asthmatics.* Allergy, 2000. **55**(11): p. 1042-8.
552. Zhang, S., P.H. Howarth, and W.R. Roche, *Cytokine production by cell cultures from bronchial subepithelial myofibroblasts.* J Pathol, 1996. **180**(1): p. 95-101.
553. Zhang, S., et al., *Cell cultures from bronchial subepithelial myofibroblasts enhance eosinophil survival in vitro.* Eur Respir J, 1996. **9**(9): p. 1839-46.
554. Zoratti, E.M., et al., *The effect of platelet-activating factor on the generation of superoxide anion in human eosinophils and neutrophils.* J Allergy Clin Immunol, 1991. **88**(5): p. 749-58.