

PNEUMON • VOL. 22 • No 2 • APRIL-JUNE 2009

ΠΝΕΥΜΩΝ • ΤΟΜΟΣ 22 • ΤΕΥΧΟΣ 2 • ΑΠΡΙΛΙΟΣ-ΙΟΥΝΙΟΣ 2009

ΠΝΕΥΜΩΝ

ΤΡΙΜΗΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
GREEK BRONCHOLOGIC
SOCIETY

PNEUMON

QUARTERLY MEDICAL JOURNAL

ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
HELLENIC THORACIC
SOCIETY

ISSN 1105-848X

e-ISSN 1791-4914



ΑΘΗΝΑ
ATHENS

www.pneumon.org
Cited in Embase
and Google Scholar

ΠΝΕΥΜΩΝ

ΤΡΙΜΗΝΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
GREEK BRONCHOLOGIC
SOCIETY

PNEUMON

QUARTERLY MEDICAL JOURNAL

ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
HELLENIC THORACIC
SOCIETY

ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ



ΕΠΙΣΗΜΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΟΡΓΑΝΟ



ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

Ιδιοκτήτης: ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ

ISSN 1105-848X
e-ISSN 1791-4914

www.pneumon.org
www.mednet.gr/pneumon
www.hts.org.gr

cited in
IATROTEK
Google Scholar
EMBASE

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

FREE ONLINE ACCESS

ΕΤΗΣΙΕΣ ΣΥΝΔΡΟΜΕΣ

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

Εκτύπωση:

ΤΕΧΝΟΓΡΑΜΜΑ

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

Εκδότης: Μ. Στεφανάκης

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Διευθυντής Σύνταξης: Δημοσθένης Μπούρος

Βοηθοί σύνταξης: Μιχάλης Τουμπής
Επαμεινώνδας Κοσμάς
Κώστας Κωστίκας
Στέλιος Λουκίδης

Πέτρος Μπακάκος
Ιωάννης Πνευματικός
Γεώργιος Σταθόπουλος

Διεθνής Συντακτική Επιτροπή

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

Μέλη Εθνικής Συντακτικής Επιτροπής

Ουρανία Αναγνωστοπούλου (Αθήνα)
Νέστωρ Αγκομαχαλελής (Θεσ/νίκη)
Παρασκευή Αργυροπούλου (Θεσ/νίκη)
Θεόδωρος Βασιλακόπουλος (Αθήνα)
Νικόλαος Γαλάνης (Θεσ/νίκη)
Δημήτριος Γεωργόπουλος (Ηράκλειο)
Μίνα Γκάγκα (Αθήνα)
Δημήτριος Γκιουλέκας (Θεσ/νίκη)
Κώστας Γουργουλιάνης (Λάρισα)
Γεώργιος Δημόπουλος (Αθήνα)
Σπύρος Ζακυνθινός (Αθήνα)
Κώστας Ζαρογουλίδης (Θεσ/νίκη)
Κωνσταντίνος Κατής (Αθήνα)
Αντωνία Κουτσούκου (Αθήνα)
Κώστας Κωνσταντίνου (Αθήνα)
Σταύρος Κωνσταντόπουλος (Ιωάννινα)
Κατερίνα Μαλαγάρη (Αθήνα)
Αργύρης Μιχαλόπουλος (Αθήνα)
Γεώργιος Μπαλτόπουλος (Αθήνα)
Παναγιώτης Μπεχράκης (Αθήνα)
Γεώργιος Νάκος (Ιωάννινα)
Δώρα Ορφανίδου (Αθήνα)
Δημήτριος Πατάκας (Θεσ/νίκη)
Βλάσης Πολυχρονόπουλος (Αθήνα)
Αντώνης Ρασιδάκης (Αθήνα)
Χαράλαμπος Ρούσσος (Αθήνα)
Νικόλαος Σιαφάκας (Ηράκλειο)
Λάζαρος Σιχλιτιδής (Θεσ/νίκη)
Ιωάννης Τσανάκας (Θεσ/νίκη)
Γεώργιος Τσελέπης (Αθήνα)
Μάριος Φρουδαράκης (Αλεξανδρούπολη)
Πανδώρα Χριστάκη (Θεσ/νίκη)

ΠΝΕΥΜΩΝ

ΤΡΙΜΗΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΒΡΟΓΧΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
GREEK BRONCHOLOGIC
SOCIETY

PNEUMON

QUARTERLY MEDICAL JOURNAL

ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
HELLENIC THORACIC
SOCIETY

THE HELLENIC
THORACIC
SOCIETY
(HTS)



OFFICIAL JOURNAL



THE GREEK
BRONCHOLOGIC
SOCIETY
(GBS)

Owner: GREEK BRONCHOLOGIC SOCIETY

ISSN 1105-848X
e-ISSN 1791-4914

www.pneumon.org
www.mednet.gr/pneumon
www.hts.org.gr

cited in
IATROTEK
Google Scholar
EMBASE

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

FREE ONLINE ACCESS

ANNUAL SUBSCRIPTIONS

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

Publisher:

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

EDITORIAL BOARD

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

Associate Editors: Michael Toumbis, MD
Epaminontas Kosmas, MD, FCCP
Kostas Kostikas, MD, FCCP
Stelios Loukidis, MD, FCCP

Petros Bakakos, MD
Ioannis Pneumatikos, MD, FCCP
Georgios Stathopoulos, MD

International Board

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

National Board

Ourania Anagnostopoulou (Athens)
Nestor Angomachalelis (Thessaloniki)
Paraskevi Argyropoulou (Thessaloniki)
George Baltopoulos (Athens)
Panagiotis Behrakis (Athens)
Pandora Christaki (Thessaloniki)
George Dimopoulos (Athens)
Marios Froudarakis (Alexandroupolis)
Mina Gaga (Athens)
Nikolaos Galanis (Thessaloniki)
Demetrios Georgopoulos (Heraklion)
Demetrios Gioulekas (Thessaloniki)
Kostas Gourgoulis (Larisa)
Konstantinos Katis (Athens)
Kostas Konstantinou (Athens)
Stavros Konstantopoulos (Ioannina)
Antonia Koutsoukou (Athens)
Katerina Malagari (Athens)
Argyris Michalopoulos (Athens)
George Nakos (Ioannina)
Dora Orfanidou (Athens)
Demetrios Patakas (Thessaloniki)
Vlasis Polychronopoulos (Athens)
Antonis Rassidakis (Athens)
Charalampos Roussos (Athens)
Nikolaos Siafakas (Heraklion)
Lazaros Sichletidis (Thessaloniki)
Ioannis Tsanakas (Thessaloniki)
George Tselepis (Athens)
Theodoros Vassilakopoulos (Athens)
Spyros Zakyntinos (Athens)
Kostas Zarogoulidis (Thessaloniki)

Περιεχόμενα

ΓΡΑΜΜΑ ΤΟΥ ΔΙΕΥΘΥΝΤΗ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

Ο ΠΝΕΥΜΩΝ ΣΤΟ EMBASE!

Δ. Μπούρος 118

ΑΡΘΡΑ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

Μήπως υπερθεραπεύουμε το ήπιο επιμένον άσθμα;

Σ. Λουκίδης, Κ. Κωστίκας, Π. Μπακάκος 120

Σύνδρομο πνευμονικής ίνωσης-εμφυσήματος

Δ. Μπούρος 126

ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Επίδραση της χαμηλής δόσης ενδοτοξίνης (LPS)

σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα πριν από έκθεση σε όζον

Διαφορές ανάμεσα σε ποντικούς άγριου τύπου και με γενετική
εξάλειψη του επιφανειοδραστικού παράγοντα πρωτεΐνη Α

R. Haque, T.M. Umstead, K. Ahn, D.S. Phelps, J. Floros 131

Κλινικά, ακτινολογικά και μοριακά ευρήματα σε τρεις ασθενείς με
ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, μετά από μακροχρόνια χορήγηση
ιντερφερόνης γ-1b

A. Πρόκλου, Φ. Οικονομίδου, Κ. Αντωνίου, Ε. Τζωρτζάκη,

A. Βολουδάκη, Κ. Μαλαγάρη, Ν. Σιαφάκας 156

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Μέθοδοι τεκμηρίωσης της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας
νέων φαρμακοτεχνικών μορφών εισπνεόμενων φαρμάκων που
εμπεριέχουν κορτικοστεροειδές και/ή β2-διεγέρτη

Δ. Μπούρος 169

ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΥΣΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ

Δύο περιπτώσεις βρογχο-πνευμονικών δυσπλασιών που προέρχονται
από το πρόσθιο αρχέγονο έντερο

Ε.Δ. Σπάρταλης, Η. Λαχανάς, Δ. Παυλόπουλος, Ο.Π. Μιχαήλ,

A. Καρακατσάνη, Π. Τόμος 178

ΕΠΙΚΗΔΕΙΟΣ

Αναφορά στον Ευάγγελο Σωληναραίο, Φυματιολόγο-Παθολόγο
(1915-2008)

Μ. Ζαχαριάδης 186



PNEUMON

Vol. 22, No 2
April - June 2009

Contents

LETTER FROM THE EDITOR

PNEUMON IN EMBASE!

D. Bouros 118

EDITORIALS

Do we overtreat mild persistent asthma?

S. Loukides, K. Kostikas, P. Bakakos 123

Combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome

D. Bouros 128

ORIGINAL STUDIES

Effect of low doses of lipopolysaccharide prior to ozone exposure on bronchoalveolar lavage. Differences between wild type and surfactant protein A-deficient mice

R. Haque, T.M. Umstead, K. Ahn, D.S. Phelps, J. Floros 143

Clinical, radiological and molecular effects in three patients with idiopathic pulmonary fibrosis after long-term treatment with interferon gamma-1b

A. Proklou, F. Economidou, K.M. Antoniou, E.G. Tzortzaki,
A. Voloudaki, K. Malagari, N.M. Siafakas 162

REVIEW

Methods for the documentation of the efficacy and safety of new formulations of inhaled drugs containing a corticosteroid and/or a β 2-agonist

D. Bouros 174

CASE REPORT

Two cases of broncho-pulmonary foregut malformations

E.D. Spartalis, E. Lachanas, D. Pavlopoulos, O.P. Michail,
A. Karakatsani, P. Tomos..... 182

OBITUARY

Evangelos Solinaraivos (1915-2008)

M. Zahariades 186

Γράμμα του Διευθυντή Σύνταξης

Ο ΠΝΕΥΜΩΝ ΣΤΟ EMBASE!

Ο ΠΝΕΥΜΩΝ έπειτα από 21 χρόνια συνεχούς κυκλοφορίας του και σε αναγνώριση της υψηλής ποιότητας της ύλης του, μπαίνει σε διεθνείς βάσεις δεδομένων. Έτσι μετά το Google Scholar, ακολουθεί η μεγάλη βάση EMBASE. Ελπίζουμε σύντομα θα ακολουθήσουν και οι άλλες (SCOPUS, MEDLINE).

Η σύνταξη του περιοδικού ευχαριστεί θερμά όλους όσους έχουν συμβάλει στην σταθερή αυτή προσπάθεια και ιδιαίτερα τους συγγραφείς που έχουν στείλει την καλύτερη ποιοτική τους εργασία, την συντακτική επιτροπή και τους κριτές.

Ελπίζουμε ότι και στο μέλλον θα έχουμε ακόμα μεγαλύτερη συνεργασία στην σταθερή μας πορεία προς την αριστεία.

Ακολουθεί η επιστολή που λάβαμε πρόσφατα από την **Elsevier Bibliographic Databases**.

Δημοσθένης Μπούρος
Διευθυντής σύνταξης

Letter from the Editor

PNEUMON IN EMBASE!

We are proud to announce that PNEUMON in recognition of its high quality and relevance to the scientific community has been selected for coverage in the Elsevier Bibliographic Databases as of 2009.

The editor of the Journal would like to thank all the authors, the editorial board and the reviewers for their great job. We are sure that in the near future, other databases (SCOPUS, MEDLINE) will follow soon. We count on your continuous support en route for excellence!

The notification of coverage from the **Elsevier Bibliographic Databases** follows.

Demosthenes Bouros MD, PhD, FCCP
Editor-in-chief

NOTIFICATION OF COVERAGE & COMPLIMENTARY SUBSCRIPTION REQUEST

Pneumon will be covered by Embase

Dear Sir/Madam,

In recognition of the high quality and relevance to the scientific community of the journal listed, we are pleased to inform you that your publication has been selected for coverage in the Elsevier Bibliographic Databases indicated above as of 2009.

We would like to request a complimentary subscription so that we may properly index this title. As you will no doubt already know, inclusion in abstract & indexing (A&I) databases increases the visibility and awareness of your full-text journals. The A&I databases will drive usage and traffic to your full-text platforms with sophisticated linking technologies, increasing journal brand awareness and subscription sales.

Since efficient coverage and rapid record processing enhance the value of any database – increasing its benefits to you as a publisher – we would like to ask your cooperation in granting us online access to the publication website.

Our databases include standard A&I record components. Please be assured that we do not make any full text available or provide content to any third parties.

Please feel free to contact me for additional information or to address any questions that you may have. Thank you in advance for your cooperation.

Sincerely,
Jaqui Mason (Ms),
Vice President, BD Operations

Elsevier Bibliographic Databases produces a range of leading abstract & indexing databases, which scans the world's STM serials literature for coverage across all science and social sciences disciplines. Databases include Scopus, EMBASE, EMCare, Compendex, GEOBASE, Elsevier BIOBASE, FLUIDEX, World Textiles and several specialized niche databases and other derivative products such as Mosby Yearbooks.

Scopus, the largest abstract and citation database of research literature and quality web sources, was created for researchers to help them find the quality information they need from around the globe. Since its introduction in 2004, Scopus has developed a solid customer base of over 1000 institutional customers worldwide enabling millions of users to make their literature research process more effective and productive.

For an overview and details of Elsevier Bibliographic Databases, please visit www.elsevier.com (click on Bibliographic databases) and www.info.scopus.com

Μήπως υπερθεραπεύουμε το ήπιο επιμένον άσθμα;

**Στέλιος Λουκίδης¹,
Κωνσταντίνος Κωστίκας²,
Πέτρος Μπακάκος¹**

¹Λέκτορας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών - Συντακτική ομάδα Πνεύμων,
²Λέκτορας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας - Συντακτική ομάδα Πνεύμων

Οι ασθενείς με ήπιο επιμένον άσθμα αποτελούν τη μεγάλη πλειονότητα των ασθματικών ασθενών σε ποσοστό που φτάνει το 70%. Αποκαλούνται η «σιωπηλή πλειονότητα» γιατί σπάνια επισκέπτονται τον οικογενειακό τους ιατρό με συμπτώματα της νόσου και σπάνια πηγαίνουν στο Νοσοκομείο. Γι' αυτό το λόγο δεν έχει δοθεί η απαιτούμενη προσοχή στη νοσηρότητα που σχετίζεται με το ήπιο επιμένον άσθμα. Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες μελέτες που υποτίθεται ότι περιέλαβαν ασθενείς με ήπιο άσθμα έχουν συμπεριλάβει ασθενείς με ήπιο έως μέτριο άσθμα με FEV1 περίπου 70% της προβλεπόμενης ή χρήση β2-αγωνιστή κατ'επίκληση 2-3 φορές/ημέρα ή και τα δύο¹⁻⁴. Στη μελέτη OPTIMA αξιολογήθηκε η προσθήκη μακράς δράσης β2-αγωνιστή (LABA) στα εισπνεόμενα κορτικοειδή (ICS) ως προς τη μείωση των ασθματικών παροξύνσεων σε ασθενείς με ήπιο επιμένον άσθμα. Στη μελέτη αυτή υπήρχαν δύο ομάδες ασθενών: η ομάδα Α περιέλαβε 700 ασθενείς με ήπιο επιμένον άσθμα που δεν είχαν ποτέ λάβει ICS. Στην ομάδα αυτή, η βουδεσονίδη (200mg/ημέρα) συγκρίθηκε με την ίδια δόση ICS + φορμοτερόλη ή placebo για 1 έτος. Η πρωταρχική παράμετρος που αξιολογήθηκε ήταν η συχνότητα των παροξύνσεων. Αυτή βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα που έλαβε placebo σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε τη χαμηλή δόση ICS. Ο συνδυασμός βουδεσονίδης-φορμοτερόλης δεν προσέφερε κανένα επιπρόσθετο όφελος σε σύγκριση με τη βουδεσονίδη μόνη⁵. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι σε ασθενείς με ήπιο επιμένον άσθμα που δεν έχουν λαβει προηγουμένως ICS, η χαμηλή δόση ICS είναι η προτιμώμενη θεραπευτική επιλογή. Στην ομάδα Β συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με μέτριο επιμένον άσθμα. Αυτοί οι ασθενείς έδειξαν σημαντική ελάττωση στη συχνότητα των ασθματικών παροξύνσεων όταν η φορμοτερόλη προστέθηκε στη βουδεσονίδη. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι ο συνδυασμός LABA/ICS ωφελεί ασθενείς με μέτριο επιμένον άσθμα που δεν ελέγχονται ικανοποιητικά μόνο με ICS⁵. Στη μελέτη START 7000 ασθενείς με ήπιο επιμένον άσθμα έλαβαν βουδεσονίδη ή placebo για 3 χρόνια. Στον τρίτο χρόνο της μελέτης το 50% των ασθματικών που έλαβαν placebo χρειάστηκαν επιπρόσθετη θεραπεία με κορτικοειδή και το 6% παρουσίασε σοβαρή παρόξυνση ενώ το 30% των ασθενών που ελάμβαναν βουδεσονίδη χρειάστηκε επιπρόσθετη θεραπεία με κορτικοειδή και 3% παρουσίασε σοβαρή παρόξυνση. Οι μεταβολές στον προ- και μετά βρογχοδιαστολή FEV1 αν και ήταν στατιστικά σημαντικές ήταν ωστόσο μικρές στο τέλος των 3 ετών θεραπείας⁶. Στη μελέτη IMPACT οι ερευνητές αξιολόγησαν την διαλείπουσα χορήγηση ICS, κατευθυνόμενη από ένα

Αλληλογραφία:

Πέτρος Μπακάκος
Κόνωνος 11, Παγκράτι, Αθήνα
Τηλ.: 210 7763452, Fax: 210 7770423
e-mail: petros44@hotmail.com

πλάνο με βάση τα συμπτώματα του ασθενούς μόνη ή προστιθέμενη σε καθημερινή θεραπεία με βουδεσονίδη ή με αντιλευκοτριένια σε 225 ασθενείς με ήπιο επιμέμον άσθμα για 1 χρόνο⁷. Τα ευρήματα της μελέτης έδειξαν ότι οι ασθενείς αυτοί μπορεί να θεραπεύονται αποτελεσματικά με διαλείπουσες ώσεις ICS ή από του στόματος κορτικοειδών μαζί με ένα πλάνο δράσης (action plan). Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από τους ερευνητές παρόλο που η τακτική καθημερινή χορήγηση ICS υπερτερούσε σημαντικά της διαλείπουσας χορήγησης στη βελτίωση του προ βρογχοδιαστολής FEV1, στα σκορ συμπτωμάτων, στις ημέρες ελεύθερες συμπτωμάτων άσθματος, στη βρογχική υπεραντιδραστικότητα και στους δείκτες φλεγμονής όπως τα ηωσινόφιλα πτυέλων και το εκπνεόμενο μονοξείδιο του αζώτου (eNO). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις παροξύνσεις μεταξύ των δυο ομάδων. Οι παροξύνσεις αποτελούν σημαντική παράμετρο αποτελεσματικότητας αφού είναι γνωστό ότι ακόμα και ασθενείς με ήπιο επιμέμον άσθμα μπορεί να παρουσιάσουν σοβαρές ή και δυνητικά θανατηφόρες παροξύνσεις.

Η αξιολόγηση ασθενών με ήπιο επιμέμον άσθμα είναι δύσκολη. Αυτό συμβαίνει γιατί η βελτίωση του FEV1 και της PEF που αποτελούν πρωταρχικές παραμέτρους αξιολόγησης στις μελέτες ασθματικών δεν αποτελούν την καλύτερη επιλογή στο ήπιο επιμέμον άσθμα και το ίδιο ισχύει και για τα σκορ συμπτωμάτων και τα ερωτηματολόγια ποιότητας ζωής. Έτσι απαιτούνται μελέτες με πολύ μεγάλο αριθμό ασθενών για να γίνουν διακριτές μικρές μεταβολές όπως αναμένεται να είναι σε αυτές τις παραμέτρους. Οι τρέχουσες θέσεις ομοφωνίας της GINA συνιστούν θεραπεία με χαμηλή δόση ICS για ασθματικούς ασθενείς στο βήμα 2 που ουσιαστικά είναι οι ασθενείς με ήπιο επιμέμον άσθμα σύμφωνα με την προηγούμενη ταξινόμηση⁸. Η χορήγηση της χαμηλής δόσης ICS προτείνεται να διαρκεί τουλάχιστον 3 μήνες ώστε να είναι εφικτό να φανεί θεραπευτικό όφελος.

Κατά συνέπεια ένα άλλο ερώτημα ανακύπτει: Ποιός είναι ο καλύτερος τρόπος για αποκλιμάκωση της θεραπείας σε έναν ασθενή με ήπιο επιμέμον άσθμα που ελέγχεται ικανοποιητικά με χαμηλή ως μέτρια δόση ICS; Τον Μάιο του 2007 οι αναγνώστες του περιοδικού New England Journal of Medicine ερωτήθηκαν να επιλέξουν μια από τις τρεις ακόλουθες επιλογές: (1) κατ'επίκληση ICS/αλβουτερόλη με μια συσκευή για τυχόν ασθματικά συμπτώματα (2) διακοπή ICS και αντικατάστασή τους από ανταγωνιστή λευκοτριενίων (LTRA), ή (3) συνδυασμός ICS/LABA μια φορά/ημέρα⁹. Μεταξύ των Αμερικανών Ιατρών επελέγησαν εξίσου και οι τρεις επιλογές. Αυτό δημιουργεί αρχικά μια μικρή έκπληξη αφού σύμφωνα με

τις τρέχουσες οδηγίες δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να υποστηρίζουν διαλείπουσα ή μια φορά την ημέρα χορήγηση ICS ή τη χρήση LABAs στο ήπιο επιμέμον άσθμα. Επιπρόσθετα, η διακοπή των ICS και αντικατάστασή τους από μονοθεραπεία με αντιλευκοτριένια είναι ουσιαστικά η αντικατάσταση της προτεινόμενης θεραπείας από μια εναλλακτική αλλά όχι προτιμώμενη.

Η τριχογνωμία στην ιατρική επιλογή αναδεικνύει κατά τον πιο ανάγλυφο τρόπο τη διαφωνία που υπάρχει σε μια συνηθισμένη κατάσταση όπως η αποκλιμάκωση της θεραπευτικής αγωγής στο ήπιο άσθμα.

Μια πρόσφατη μεγάλη μελέτη (ALA-ACRC) περιέλαβε 500 ασθενείς με ήπιο επιμέμον άσθμα που ελέγχονταν ικανοποιητικά με χαμηλή δόση ICS. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν είτε να συνεχίσουν με χαμηλή δόση ICS δυο φορές/ημέρα, είτε να λάβουν μονοθεραπεία με ανταγωνιστή λευκοτριενίων, είτε να λάβουν συνδυασμό χαμηλής δόσης ICS/LABA μία φορά την ημέρα¹⁰. Ως θεραπευτική αποτυχία καθορίστηκε η μείωση του FEV1 κατά 20% και ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα των αντιλευκοτριενίων ενώ δεν υπήρχε διαφορά στις άλλες δυο ομάδες. Έτσι προτάθηκε ότι η αποκλιμάκωση της χαμηλής δόσης ICS δυο φορές/ημέρα μπορεί να γίνει επιτυχώς σε συνδυασμό ICS/LABA μια φορά/ημέρα, με μείωση κατά το ήμισυ της δόσης των ICS. Ωστόσο, το συμπέρασμα αυτό ανισχυροποιείται από το γεγονός ότι η μελέτη δεν περιέλαβε ομάδα με χορήγηση ICS μια φορά/ημέρα.

Μια άλλη μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη περιέλαβε 455 ασθενείς με ήπιο επιμέμον άσθμα που ελέγχονταν ικανοποιητικά με χαμηλή δόση ICS δυο φορές/ημέρα. Η αποκλιμάκωση της θεραπείας στους ασθενείς αυτούς έγινε με ένα από τους παρακάτω τέσσερις τρόπους: (1) αλβουτερόλη κατ'επίκληση (2) χαμηλή δόση ICS/αλβουτερόλη κατ'επίκληση (3) χαμηλή δόση ICS δυο φορές/ημέρα (4) χαμηλή δόση ICS/αλβουτερόλη δυο φορές/ημέρα. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις πρωταρχικές παραμέτρους αξιολόγησης στους τρεις βραχίονες που περιλάμβαναν ICS, αλλά η κατ'επίκληση χαμηλή δόση ICS/αλβουτερόλη επέτυχε τους στόχους με υποτετραπλάσια δόση ICS¹¹. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι λιγότερο από χαμηλή ημερήσια δόση ICS μπορεί να επαρκεί για την επίτευξη του ελέγχου της νόσου σε ήπιο επιμέμον άσθμα παρέχοντας ταυτόχρονα το πλεονέκτημα της μείωσης των παροξύνσεων.

Ένα τελευταίο ερώτημα σχετικά με τα ICS στο ήπιο επιμέμον άσθμα είναι το κατά πόσον η τακτική χορήγηση τους προλαμβάνει την μείωση της πνευμονικής λειτουργίας που σχετίζεται με το άσθμα και έτσι αλλάζει τη φυσική ιστορία της νόσου. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει τυχαιοποι-

ημένη κλινική μελέτη που να έχει απαντήσει σε αυτό το ερώτημα. Μόνο η μελέτη CAMP έδειξε ότι σε παιδιά με ήπιο-μέτριο άσθμα η απουσία τακτικής θεραπείας με ICS για 4-6 χρόνια δεν σχετίζεται με πρόοδο της νόσου¹².

Η κατ'επίκληση χορήγηση ICS μαζί με ένα εισπνεόμενο β2-αγωνιστή βραχείας δράσης φάνηκε υποσχόμενη σε μια μελέτη, αλλά χρειάζεται επιβεβαίωση και σε άλλες. Αποτελεί αναμφισβήτητα μια ελκυστική επιλογή σε σύγκριση με την τακτική (καθημερινή) θεραπεία γιατί καθορίζει μια ελάχιστη, σχεδόν μηδαμινή έκθεση στα κορτικοειδή. Εντούτοις, δεν είναι ξεκαθαρισμένο εάν

η διαλείπουσα θεραπεία με ICS που είναι κλινικά αποτελεσματική καταστέλλει και τη χρόνια φλεγμονή ή τη βρογχική υπεραντιδραστικότητα που σχετίζεται με τη νόσο. Εναλλακτικά, μπορεί η διαλείπουσα χορήγηση ICS να αποτελέσει ενδιάμεσο βήμα στην πλήρη απόσυρση της θεραπείας ελέγχου εφόσον η νόσος ελέγχεται ικανοποιητικά με την τακτική θεραπεία με τα ICS.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(Βλέπε αγγλικό κείμενο)

Do we overtreat mild persistent asthma?

**Stelios Loukides¹,
Konstantinos Kostikas²,
Petros Bakakos¹**

¹Lecturer, University of Athens Medical School
- Editorial Board Pneumon

²Lecturer, University of Thessaly Medical
School - Editorial Board Pneumon

Patients with mild persistent asthma constitute a large proportion of asthmatic patients, the percentage reaching almost 70%. These patients are called the silent majority, because they rarely visit the family doctor with symptoms of the disease and they are seldom seen in the hospital. For this reason, very little attention has been paid to the morbidity associated with mild persistent asthma. In practice, most studies that claim to have included patients with mild asthma have studied patients with mild to moderate asthma, with FEV1 around 70% of predicted normal, rescue β_2 agonist use of 2-3 puffs per day, or both¹⁻⁴. In the OPTIMA trial the benefits of adding a long acting β_2 agonist (LABA) to inhaled corticosteroids (ICS) for the reduction of exacerbations was tested in patients with mild persistent asthma. In OPTIMA, two groups of patients were selected: the first (group A) consisted of almost 700 patients with mild persistent asthma who had never used ICS. In this group, budesonide alone (200mg/day) was compared to the same dose of budesonide plus formoterol or placebo for 1 year of treatment. The primary outcome measure was the rate of severe exacerbations, which was found significantly higher in the placebo-treated group than in the group with low-dose budesonide alone. The combination of budesonide and formoterol did not provide any additional benefit when compared to budesonide alone⁵. This finding suggested that for steroid naive asthmatic patients with mild persistent asthma, low-dose ICS alone are the preferred treatment option. The second group (group B) consisted of patients with moderate asthma using ICS at study entry. These patients showed a striking difference in asthma exacerbations when formoterol was added to budesonide. This finding suggests that combination treatment benefits moderate asthmatics not well controlled on ICS alone⁵. In the START study 7,000 patients with mild persistent asthma were enrolled and treated with low dose ICS or placebo for 3 years. By year 3 of the study, 50% of placebo-treated patients required additional corticosteroid treatment, and 6% had had a severe asthma exacerbation, compared to 30% requiring corticosteroid treatment and 3% with an exacerbation in the budesonide-treated group. The changes in pre- and post bronchodilator FEV1, while statistically significant, were small at the end of 3 years of treatment⁶. In the IMPACT study, researchers assessed intermittent short-course ICS, guided by a symptom-based action plan, alone or in addition to daily treatment with either budesonide or an anti-leukotriene in 225 adult patients with mild persistent asthma for 1 year⁷. The findings of this study indicated that these patients can be treated with intermittent courses of inhaled or oral corticosteroids, together with an action plan. This conclusion was reached

Correspondence:

Petros Bakakos
11 Kononos Str., Pagrati, Athens
Tel.: 210 7763452, Fax: 210 7770423
e-mail: petros44@hotmail.com

although the regular use of inhaled budesonide was significantly better than intermittent use according to several variables, namely improving the prebronchodilator FEV1, asthma control scores, number of symptom free days, airway hyperresponsiveness and markers of airway inflammation such as sputum eosinophils and exhaled nitric oxide. There was no difference between the two groups in the occurrence of severe asthma exacerbations. Exacerbations are an important outcome, since it is known that even patients with mild asthma are at risk of severe and even fatal asthma exacerbations.

It is quite difficult to assess accurately patients with mild persistent asthma. This is because neither improvements in FEV1 and PEF which are usually used as primary outcomes, nor symptom scores, questionnaires or quality of life methods are the best choice of measurement. Large sample sizes are required to provide adequate power for these measurements, because of the small changes that are likely to be observed. Current international GINA guidelines recommend regular treatment with ICS for asthmatic patients at step 2, i.e., those previously defined as mild persistent asthma⁸. A trial of low dose ICS is recommended for all patients with mild persistent asthma and should be continued for at least 3 months to gain a therapeutic benefit.

Accordingly, another question is being raised: Which is the best way to de-escalate (step-down) treatment in a patient with mild persistent asthma who is well controlled on low to medium dose ICS? In May 2007, the readers of New England Journal of Medicine were asked to select one of the following three options: (1) prescribe as-needed ICS/albuterol in a single inhaler for asthma symptoms (2) discontinue ICS and substitute by a leukotriene receptor antagonist (LTRA), or (3) prescribe once-daily ICS/LABA combination⁹. An equal selection by readers of the three options was observed in the U.S. This was somehow surprising in view of the guidelines that indicate that there are insufficient data to recommend intermittent or once-daily use of ICS or the use of LABAs in mild persistent asthma. In effect, the complete discontinuation of ICS treatment and its substitution by LTRA monotherapy constitutes substitution of the recommended treatment an alternate but not preferable treatment. This division of doctors in their preferred choice shows in the most elegant way the discrepancy that prevails in a common situation, i.e., step-down therapy for mild asthma.

The American Lung Association-Asthma Clinical Research Centers (ALA-ACRC) conducted a large clinical trial including 500 patients with mild persistent asthma well

controlled on low-dose ICS. Patients were randomized to either continue on twice-daily low-dose ICS, or step-down to an LTRA alone (montelukast), or step-down to a low-dose ICS/LABA combination once daily (10). Treatment failure was defined as a >20% decrease in FEV1 and this was greater in subjects who received an LTRA, but there was no difference between other treatment groups. Thus, it was suggested that twice-daily ICS could be stepped down to once-daily ICS/LABA, effectively halving the dose of ICS. However, this conclusion is limited by the fact that the study did not contain a group taking ICS alone once daily.

In another large randomized clinical trial, 455 patients with mild persistent asthma well controlled on twice-daily low-dose ICS were included. The subjects were stepped down to one of four treatment regimes: two as-needed regimes, namely (group 1) albuterol only and (group 2) low-dose ICS/albuterol, and two twice-daily regimes, namely (group 3) low-dose ICS twice daily and (group 4) low-dose ICS/ albuterol twice daily. No differences in the primary endpoints were observed in the three ICS regimes, but those taking the as-needed low-dose ICS/ albuterol regime (group 2) achieved the endpoints with a fourfold lower dose of ICS¹¹. The results of this study suggest that less than daily low-dose ICS alone may be sufficient to achieve good asthma control in mild persistent asthma and provide the benefit of reducing exacerbations.

A final question raised about ICS in mild persistent asthma is whether regular use of ICS can prevent the decline of lung function associated with asthma and thus alter the natural history of the disease. To date, no randomized clinical trial has properly addressed this question. Only the Children Asthma Management Program Study (CAMP) has shown that in children with mild-to-moderate asthma the lack of regular treatment with ICS for four to six years is not associated with progression of the disease¹².

The "as needed" use of ICS together with an inhaled/ β 2 agonist has shown promise in one study but this finding needs to be replicated in further studies. It is certainly an appealing approach as compared to regular treatment, because it involves a trivial cumulative exposure to corticosteroids. However, it is not clear whether intermittent treatment with ICS in clinically effective doses suppresses the chronic airway inflammation or the airway hyperresponsiveness associated with the disease. Alternatively, it may be offered as an intermediate step towards the withdrawal of controller medication if the disease is well controlled by regular treatment with ICS.

REFERENCES

1. Pearlman DS, Berger WE, Kerwin E, LaForce C, Kundu S, Banerji D. Once-daily ciclesonide improves lung function and is well tolerated by patients with mild-to moderate persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 1206-1212.
2. Vaquerizo MJ, Casan P, Castillo J, et al. Effect of montelukast added to inhaled budesonide on control of mild to moderate asthma. *Thorax* 2003; 58: 204-210.
3. Chanez P, Karlstrom R, Godard P. High or standard initial dose of budesonide to control mild-to-moderate asthma? *Eur Respir J* 2001; 17: 856-862.
4. Rabe KF, Pizzichini E, Stallberg B, et al. Budesonide/formoterol in a single inhaler for maintenance and relief in mild-to-moderate asthma: a randomized, double-blind trial. *Chest* 2006; 129: 246-256.
5. O'Byrne PM, Barnes PJ, Rodriguez-Roisin R, et al. Low dose inhaled budesonide and formoterol in mild persistent asthma: the OPTIMA randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1392-1397.
6. Pauwels RA, Pedersen S, Busse WW, et al. Early intervention with budesonide in mild persistent asthma: a randomized, double-blind trial. *Lancet* 2003; 361: 1071-1076.
7. Boushey HA, Sorkness CA, King TS, et al. Daily versus as-needed corticosteroids for mild persistent asthma. *N Engl J Med* 2005; 352: 1519-1528.
8. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO workshop report. Updated 2006.
9. Kraft M, Israel E, O' Connor GT. Treatment of mild persistent asthma [clinical vignette]. *N Engl J Med* 2007; 356: 2096-2100.
10. American Lung Association Asthma Clinical Research Centers. Randomized comparison of strategies for reducing treatment in mild persistent asthma. *N Engl J Med* 2007; 356: 2027-2039.
11. Papi A, Canonica GW, Maestrelli P, Paggiaro P, et al. BEST study Group. Rescue use of beclomethasone and albuterol in a single inhaler. *N Engl J Med* 2007; 356: 2163-2173.
12. The Childhood Asthma Management Program Research Group. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. *N Engl J Med* 2000; 343: 1054-1063.

Σύνδρομο πνευμονικής ίνωσης-εμφυσήματος

Δημοσθένης Μπούρος

Καθηγητής Πνευμονολογίας ΔΠΘ,
Διευθυντής Σύνταξης,
Διευθυντής Πνευμονολογικής Κλινικής
και Τομέα Παθολογίας, Πανεπιστημιακό
Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης και Ιατρικό
Τμήμα ΔΠΘ

Η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση (ΙΠΙ) είναι η πιο συχνή ιδιοπαθής διάμεση πνευμονία¹. Πρόσφατα αναγνωρίζεται όλο και συχνότερα σύνδρομο το οποίο περιλαμβάνει εμφυσηματικές αλλοιώσεις στους άνω λοβούς και πνευμονική ίνωση στους κάτω λοβούς. Καλείται δε σύνδρομο συνδυασμού πνευμονικής ίνωσης – εμφυσήματος (ΣΣΠΙ-Ε) (**combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) syndrome**). Αρχικά θεωρήθηκε ως τυχαία συνύπαρξη των δύο² ενώ σήμερα προτείνεται ως νέο σύνδρομο^{3,4}. Το ΣΣΠΙ-Ε θεωρείται ξεχωριστό από την ΙΠΙ, έχει ιδιαίτερα απεικονιστικά χαρακτηριστικά, σχετική διατήρηση των πνευμονικών όγκων, σημαντική μείωση της διαχυτικής ικανότητας, και της PaO₂ κατά την άσκηση, και μεγάλη συχνότητα αυξημένης πνευμονικής υπέρτασης που έχει ως συνέπεια την **κακή πρόγνωση**. Είναι συχνότερη στους άνδρες που είναι καπνιστές ή πρώην καπνιστές που έχουν καπνίσει περισσότερο από 40 πακέττα-έτη. Η μέση ηλικία είναι 65 έτη. Κλινικά οι ασθενείς έχουν δύπνοια και αντικειμενικά ανευρίσκονται λεπτοί μη μουσικοί ρόγχοι στις βάσεις.

Η **διάγνωση** στηρίζεται στα ευρήματα της υπολογιστικής τομογραφίας υψηλής ευκρίνειας (HRCT) του θώρακος, η οποία δείχνει είτε κεντρολοβιώδες εμφύσημα ή φυσαλιδώδες εμφύσημα στα άνω πνευμονικά πεδία, συνοδευόμενη στο 90% των περιπτώσεων από παραδιαφραγματικό εμφύσημα και διάχυτη πνευμονική ίνωση στις βάσεις (υποϋπεζωκοτικές δικτυωτές σκιάσεις, εικόνα κηρήθρας, βρογχιεκτασίες εξ έλξεως), (Εικόνα 1). **Πνευμονική υπέρταση** παρατηρείται σχεδόν στο ήμισυ των περιπτώσεων και είναι ο κύριος προγνωστικός παράγοντας κακής εξέλιξης. Η μέση επιβίωση παρουσία πνευμονικής υπέρτασης υπολογίζεται σε **25 μήνες**, ενώ στους ασθενείς με ΙΠΙ αυτή είναι 34 μήνες⁴.

Επί του παρόντος υπάρχει **διαφωνία** αν το ΣΣΠΙ-Ε αποτελεί ξεχωριστό σύνδρομο όπως συνέβει με την ΙΠΙ και την μη ειδική διάμεση πνευμονία ή απλή παρουσία εμφυσηματικών βλαβών στην HRCT σε καπνιστές με ΙΠΙ. Η διαφωνία αυτή θα εκφράζεται στις νέες, υπό δημοσίευση διεθνείς οδηγίες για την ΙΠΙ⁵.

Υποστηρικτική του συνδρόμου είναι πρόσφατη δημοσίευση των Mejia M et al⁴ οι οποίοι από 110 ασθενείς με ΙΠΙ, οι 31 (**28%**) είχαν **ΙΠΙ με εμφύσημα** και μεγαλύτερη θνητότητα από τους ασθενείς χωρίς εμφύσημα (η μέση επιβίωση ήταν 25 μήνες και 34 μήνες, αντίστοιχα, p = 0.01). Επίσης βρέθηκε ότι οι ασθενείς με το σύνδρομο είχαν συχνότερα πνευμονική υπέρταση αλλά και μεγαλύτερη συστολική αρτηριακή πνευμονική πίεση στο υπερηχοκαρδιογράφημα (82.3 ± 20 mm Hg vs 56.7 ± 15 mm Hg, p < 0.0001). Επίσης οι ασθενείς με το σύνδρομο είχαν μεγαλύτερου βαθμού ίνωση στην HRCT (p=0.015), ενώ FVC, FEV₁, PaO₂ and SaO₂ δεν διέφεραν. Όμως, η SaO₂ κατά

Αλληλογραφία:

Δημοσθένης Μπούρος
Πνευμονολογική Κλινική
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης
681 00 Αλεξανδρούπολη
Tel. / fax: 25510 76106
e-mail: bouros@med.duth.gr



ΕΙΚΟΝΑ 1. Υπολογιστική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας σε ασθενή με σύνδρομο πνευμονικής ίνωσης – εμφυσήματος. Κεντρο-λοβιώδες εμφύσημα στις κορυφές (Α) και καταστροφικό εμφύσημα στις βάσεις με παρουσία διάμεσης πνευμονικής ίνωσης (Β). (Ιδία περπίττωση).

την άσκηση ήταν μικρότερη στο ΣΣΠΙ-Ε ($p < 0.01$).

Βάσει της μελέτης αυτής προτείνεται σε κάθε μελέτη σχετική με την ΙΠΙ πρέπει να αναφέρεται ρητά αν έχουν συμπεριληφθεί ή όχι ασθενείς με ΣΣΠΙ-Ε, προκειμένου να αξιολογούνται σωστά τα αποτελέσματα αυτής (*JF Cordier, personal communication*).

Ωστόσο, άλλοι ειδικοί θεωρούν ότι είναι **πρώιμη** η αναγνώριση του συνδρόμου, επειδή δεν είναι επαρκή τα στοιχεία σχετικά με την πρόγνωση ή την αντιμετώπιση ώστε να είναι απαραίτητη η διαφοροποίηση των υπό διαμόρφωση οδηγιών.

Από πλευράς **παθογενετικών** μηχανισμών, αυτοί είναι άγνωστοι και για την πνευμονική ίνωση και για το εμφύσημα. Η υπερέκφραση του TNF- α και του PDGF- β σε πειραματόζωα έχειδειχθεί ότι προκαλεί εμφυσηματικές και ινωτικές αλλοιώσεις^{6,7}. Είναι ακόμη άγνωστο αν οι εμφυσηματικές και οι ινωτικές αλλοιώσεις εξελίσσονται χωριστά ή κάθε μία ή αν η μία είναι αποτέλεσμα της άλλης.

Είναι βέβαιο ότι απαιτούνται πολλά ακόμη για την πλήρη κατανόηση του συνδρόμου (όπως το είδος της ίνωσης αν αυτό είναι UIP ή και fibrotic NSIP)⁸. Είναι επίσης πιθανό στον ορισμό να προστεθούν και άλλα διαφορο-

διαγνωστικά χαρακτηριστικά.

Από **θεραπευτικής** σκοπιάς δεν υπάρχουν ικανοποιητικές επιλογές επί του παρόντος. Τα κορτικοστεροειδή και τα ανοσοκατασταλτικά δεν έχουν επαρκώς μελετηθεί. Η διακοπή του καπνίσματος είναι αναγκαία. Υπό μελέτη είναι η θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης συνοδού πνευμονικού εμφυσήματος, ΙΠΙ και ΣΣΠΙ-Ε. Η πρώιμη εγγραφή των ασθενών αυτών σε λίστα μεταμόσχευσης είναι επιβεβλημένη.

Εν **συμπεράσματι**, το ΣΣΠΙ-Ε είναι πιο συχνό (30%) από ότι μέχρι τώρα πιστευόταν, και έχει χειρότερη πρόγνωση από την ΙΠΙ. Παρά την ελαφρά επηρεασμένη σπιρομέτρηση, η βαρύτητα του ΣΠΠΙ-Ε είναι μεγάλη. Η παρουσία πνευμονικής υπέρτασης είναι δυσοίωνο προγνωστικό σημείο. Αν και περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες για να καθορισθούν επακριβώς οι διαφορές μεταξύ ΙΠΙ και ΣΣΠΙ-Ε, οι τελευταίοι πρέπει να αποκλείονται (ή τουλάχιστον να μελετώνται ξεχωριστά) από τις μελέτες και τις κλινικές δοκιμές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(βλ. κείμενο στα αγγλικά).

Combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome

Demosthenes Bouros MD, PhD, FCCP

Department of Pneumology
Medical School, Democritus University of
Thrace,
Alexandroupolis, Greece

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most frequent form of idiopathic interstitial pneumonia¹. Recently a syndrome including upper-lobe emphysema and pulmonary fibrosis of the lower lungs has been increasingly recognized. This syndrome, called **combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) syndrome**, was initially reported to be coincidental², but has now been proposed as a distinct syndrome^{3,4}. CPFE is an entity distinct from IPF, from which it differs by its characteristic imaging features, relatively well preserved lung volumes, strongly impaired carbon monoxide (CO) transfer, significant decrease in PaO₂ on exercise, and a high prevalence of pulmonary hypertension leading to poor outcome. It is observed most often in men who are smokers or ex-smokers of more than 40 pack-years; their mean age is 65 years. Exertional dyspnoea is always present, and basal crackles are heard on auscultation.

Pulmonary function tests usually show respiratory volumes and flows that are normal or subnormal, but CO transfer is substantially reduced and exercise hypoxaemia is present.

The diagnosis is based on findings on high resolution computed tomography (HRCT) of the chest, which show either centrilobular emphysema or upper-zone bullous emphysema, associated in 90% of cases with very suggestive paraseptal emphysema and diffuse infiltrating fibrosing lung disease at the bases (subpleural reticular opacities, honeycomb images, traction bronchiectasis), with more frequent ground glass opacities than in IPF (Figure 1). Pulmonary hypertension is present at diagnosis in almost half of all patients and represents the principal negative prognostic factor for this condition, which has a median survival of 25 months.

At present there is still some debate as to whether this is a distinct syndrome, as happened with NSIP, or just some emphysema found on the CT in smokers with IPF. This debate is going to be reflected in the new guidelines for IPF, presently under publication⁵.

Supporters of the separate syndrome point to the recent publication by Mejia et al⁴ who found that in a cohort of 110 patients with IPF, 31 (28%) patients with combined IPF and emphysema had a higher mortality than patients without CPFE (median survival time of 25 months versus 34 months, $p = 0.01$). They further showed that CPFE patients had a higher prevalence of pulmonary hypertension and had higher systolic PAP on echocardiography (82.3 ± 20 mm Hg vs 56.7 ± 15 mm Hg, $p < 0.0001$). Patients with CPFE also showed a higher HRCT fibrotic score ($p = 0.015$), while the FVC, FEV₁, PaO₂

Correspondence:

Demosthenes Bouros MD, PhD, FCCP
Professor of Pneumology
Head, Dept of Pneumology, and
Chairman, Dept of Internal Medicine, Democritus
University of Thrace and
University Hospital of Alexandroupolis
Alexandroupolis, Greece, 68100
Tel./Fax: +30-25510-76106
Email: bouros@med.duth.gr



FIGURE 1. High resolution computed tomography (HRCT) of the lungs of a patient with combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) syndrome (courtesy D. Bouros). The apical centrilobular emphysema (A) with destructive emphysema and interstitial fibrosis (B) are clearly shown.

and SaO_2 were similar in all patients, but in contrast SaO_2 on exercise was lower in patients with CPFE ($p < 0.01$).

This study brings further evidence to the validity of the concept of CPFE syndrome, and that from now any study on IPF should mention distinctly if patients with CPFE syndrome have been included in the study, thus allowing an accurate interpretation of the results (*JF Cordier, personal communication*).

However, others feel that it is too early to recognize CPFE as a separate syndrome, since to justify a new syndrome, there must be robust evidence that the syndrome has either prognostic or management significance, which changes current recommendations.

In terms of pathogenic mechanisms, these are unknown both in emphysema and fibrosis at present, although it is recognised that overexpression of tumour necrosis factor- α (TNF- α) and platelet-derived growth factor (PDGF- β) in mouse lungs produces airspace dilatation and fibrosis^{6,7}. It is also unclear whether emphysematous and fibrotic lesions progress independently or if the one is the result of the development of the other.

Therapeutic options in CPFE are limited. The patients should quit smoking. The role of corticosteroids and that of immunosuppressants have not yet been evaluated. The treatment of pulmonary hypertension in emphysema, IPF and CPFE needs evaluation. Early enrolment in the transplantation list is mandatory.

Much remains to be studied in CPFE syndrome (e.g. fibrosis is mainly UIP but other types of fibrosis may be present especially fibrotic NSIP)⁸. Perhaps the definition

of the syndrome will necessitate further differential diagnostic characteristics.

In conclusion, CPFE syndrome is more frequent (30%) than usually thought and it has a worse prognosis than IPF alone. The finding of a mild abnormality in spirometry is misleading for the evaluation of the condition, and could be responsible for the underdiagnosis of the syndrome. The presence of pulmonary hypertension is a serious sign. Although further studies are necessary to define more precisely the boundaries between IPF and CPFE, patients with CPFE syndrome should be carefully excluded (or at least stratified) from IPF studies and therapeutic trials.

REFERENCES

1. Karakatsani A, Papakosta D, Rapti A, et al. Epidemiology of interstitial lung diseases in Greece. *Respir Med*. 2009 Apr 2. [Epub ahead of print]
2. Wiggins J, Strickland B, Turner-Warwick M. Combined cryptogenic fibrosing alveolitis and emphysema: the value of high resolution computed tomography in assessment. *Respir Med* 1990; 84 : 365-9
3. Cottin V, Nunes H, Brillet PY, et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J* 2005; 26 : 586-93
4. Mejia M, Carrillo G, Rojas-Serrano J, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema: decreased survival associated with severe pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2009; 136 (*in press*).
5. Bouros D. The new ATS/ERS/JRS IPF Guidelines. *Pneumon* 2008;21:117-121.
6. Lundblad LK, Thompson-Figueroa J, Leclair T, et al. Tumor

- necrosis factor-alpha overexpression in lung disease: a single cause behind a complex phenotype. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:1363-70.
7. Hoyle GW, Li J, Finkelstein JB, Eisenberg T, et al. Emphysematous lesions, inflammation, and fibrosis in the lungs of transgenic mice overexpressing platelet-derived growth factor. *Am J Pathol.* 1999;154:1763-75.
8. Rogliani P, Mura M, Mattia P, et al. HRCT and histopathological evaluation of fibrosis and tissue destruction in IPF associated with pulmonary emphysema. *Respir Med.* 2008;102:1753-61.

Επίδραση της χαμηλής δόσης ενδοτοξίνης (LPS) σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα πριν από έκθεση σε όζον

Διαφορές ανάμεσα σε ποντικούς άγριου τύπου και με γενετική εξάλειψη του επιφανειοδραστικού παράγοντα πρωτεΐνη A

Rizwanul Haque¹,
Todd M. Umstead¹,
Kwangmi Ahn²,
David S. Phelps¹,
Joanna Floros^{1,3}

¹The Penn State Center for Host defense, Inflammation, and Lung Disease (CHILD) Research, Departments of Pediatrics, ²Public Health Sciences, ³Obstetrics and Gynecology, Pennsylvania State University College of Medicine, Hershey, PA 17033

Λέξεις κλειδιά :

- πολυμορφοπύρρνο κύτταρο
- κυτταροκίνες
- οξειδωση
- μακροφάγο
- όζον

Αλληλογραφία:

Joanna Floros,
Evan Pugh Professor of Pediatrics, and Obstetrics and Gynecology, Director, Penn State CHILD Research, Rm. C 4752, H085
The Pennsylvania State University, College of Medicine
500 University Drive, P.O. Box 850
Hershey, PA 17033-0850
Tel.: 717 531 6972, Fax: 717 531 0215
E-mail: jfloros@psu.edu

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ: Πολλές παράμετροι της φλεγμονώδους απάντησης σε ένα βλαπτικό ερέθισμα [όπως είναι η έκθεση σε όζον συγκέντρωσης 2 μέρη/εκατομμύριο (ppm) για 3 ή 6 ώρες] είναι λιγότερο ισχυρές σε ποντικούς με γενετική εξάλειψη (knock out, KO) του επιφανειοδραστικού παράγοντα A (SP-A) σε σχέση με ποντικούς άγριου τύπου (wild type, WT). Διατυπώσαμε την υπόθεση ότι ένα ήπιο ερέθισμα [για παράδειγμα μια χαμηλή δόση λιποπολυσακχαρίδης (LPS)] έχει αρνητική επίδραση στη άμυνα του ξενιστή και διαφοροποιεί την επαγόμενη από όζον βλάβη σε ποντικούς τύπου WT και KO. **ΜΕΘΟΔΟΣ:** Σε ποντικούς WT και KO χορηγήθηκαν διαφορετικές δόσεις LPS, ή LPS (2 ng) + όζον (O₃, 2 ppm), ή διηθημένος αέρας (filtered air, FA) επί 3 ώρες. Οι ποντικοί θανατώθηκαν 4 ώρες μετά την έκθεση (σε O₃ ή FA) ή συνολικά 20 ώρες μετά τη χορήγηση LPS. Στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) προσδιορίστηκαν πολλαπλά τελικά σημεία ενδεικτικά φλεγμονής. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** 1) Στις 20 ώρες μετά από χορήγηση μόνο LPS, και οι δύο ομάδες ποντικών εμφάνισαν σημεία φλεγμονής. Διαπιστώθηκαν διαφορές στο πρότυπο απάντησης της MIP-2, στον ολικό αριθμό κυττάρων (στην ομάδα των 0,5 ng LPS) και στα αρχικά επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων. 2) Οι ποντικοί KO εμφάνισαν μείωση των πολυμορφοπύρρνων (PMN) και της MIP-2 και αύξηση των φωσφολιπιδίων μετά από έκθεση σε LPS + O₃, καθώς και αύξηση του ολικού αριθμού κυττάρων μετά από LPS + FA. 3) Οι ποντικοί WT στους οποίους χορηγήθηκε LPS + FA εμφάνισαν αύξηση του SP-A, η οποία δεν επιτάθηκε στην ομάδα χορήγησης LPS + O₃, καθώς και αύξηση των διμερών οξειδωμένου SP-A μετά από έκθεση σε O₃ ή LPS + O₃. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Η χορήγηση LPS έχει αρνητικές επιπτώσεις οι οποίες εκδηλώνονται μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την έκθεση και καθιστά τους ποντικούς KO λιγότερο ικανούς να ανταποκριθούν σε ένα δεύτερο βλαπτικό ερέθισμα. Η χορήγηση LPS και η έκθεση σε O₃ επιδρούν στον SP-A ποσοτικά και ποιοτικά, αντίστοιχα. *Πνεύμων 2009, 22(2):131-142.*

"Duty is liberating. It forces you to transcend your own limitations and makes you do things that may not come naturally, but must be done, because they are right."

David Rockefeller

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λιποπολυσακχαρίδη (lipopolysaccharide, LPS) ή ενδοτοξίνη αποτελεί βασικό συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram- αρνητικών βακτηρίων. Αποτελείται από το λιπίδιο A, έναν πολυσακχαριδικό πυρήνα και το αντιγόνο O και συνιστά έναν ισχυρό επαγωγέα της φυσικής ανοσίας. Η εισπνοή ενδοτοξίνης προκαλεί επιστράτευση φλεγμονωδών κυττάρων και επάγει την παραγωγή πλήθους προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ένας σημαντικός αριθμός πρόσφατων μελετών αποκάλυψε ότι η ανοσιακή απάντηση στην ενδοτοξίνη εκδηλώνεται μέσω της αλληλεπίδρασής της με το σύμπλεγμα υποδοχέα CD14/TLR4/MD2, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων οδών του NFκΒ, οι οποίες μετέχουν στην παραγωγή κυτταροκινών σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, ιδιαίτερα στα μακροφάγα.¹⁻⁴ Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, ο TLR-4 είναι ένας άλλος βασικός παράγοντας για την πλήρη εκδήλωση της πνευμονικής βλάβης επαγόμενης από όζον.^{5,6} Η εισπνοή υψηλών συγκεντρώσεων (100 μg) LPS πριν από έκθεση σε όζον έχει διαπιστωθεί ότι ενισχύει τη δράση του και επάγει την ανάπτυξη φλεγμονής στον πνεύμονα.^{7,8}

Το όζον αποτελεί ένα ισχυρά τοξικό συστατικό του φωτοχημικού νέφους και έναν από τους κύριους υπεύθυνους της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Αντιδρά κατά κύριο λόγο με μόρια που βρίσκονται στο διαχωριστικό όριο υγρής- αέριας φάσης, επειδή η χαμηλή διαπερατότητά του στο νερό περιορίζει την ικανότητα διάχυσής του σε αυτούς τους ιστούς. Οι βιολογικές επιδράσεις του όζοντος σχετίζονται με την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα και πιθανότατα με άμεση βλάβη του επιθηλίου, καθώς και με την πυροδότηση ενός φλεγμονώδη καταρράκτη που προκαλεί έμμεσες βλάβες.⁹⁻¹¹ Οι επαγόμενες από το όζον μεταβολές στον πνεύμονα περιλαμβάνουν εισροή και ενεργοποίηση ανοσιακών κυττάρων και αύξηση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χυμοκινών, μεταξύ των οποίων είναι η χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων (MCP-1) και η φλεγμονώδης πρωτεΐνη των μακροφάγων τύπου 2 (MIP-2).^{7,8,12-14} Η έκθεση σε όζον προκαλεί επίσης δυσλειτουργία της επιφανειοδραστικής ουσίας,^{15,16} αν και οι υποκείμενοι μηχανισμοί παραμένουν ασαφείς.

Η επιφανειοδραστική ουσία του πνεύμονα είναι ένα

σύνθετο μίγμα από λιπίδια και πρωτεΐνες. Εκτός από την πρόληψη της σύμπτωσης των κυψελίδων, τα συστατικά της παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού εναντίων διάφορων βλαπτικών ερεθισμάτων. Ο επιφανειοδραστικός παράγων πρωτεΐνη A (SP-A) αποτελεί ένα βασικό πρωτεϊνικό συστατικό της επιφανειοδραστικής ουσίας, το οποίο συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες και ιδιαίτερα στην ανάπτυξη της φυσικής ανοσίας (ανασκοπείται αναλυτικά στις αναφορές 17-20). Στην τελευταία περίπτωση, ο SP-A φαίνεται ότι ενισχύει τη φαγοκυττάρωση ενός αριθμού μικροοργανισμών,²¹⁻²⁷ ρυθμίζει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος²⁸ και αυξάνει την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου (RONS), οι οποίες συνιστούν ένα μηχανισμό φόνευσης των παθογόνων.^{22,29,30} Η διαταραχή αυτών των λειτουργιών σε ποντικούς SP-A -/- (KO) τους καθιστά περισσότερο επιρρεπείς σε πνευμονία.^{27,30-32} Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής του SP-A στη ρύθμιση της φλεγμονής, ιδιαίτερα στα πλαίσια της πνευμονικής βλάβης και αποκατάστασης, μέσω ρύθμισης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών,^{2,14,33} κάθαρσης των αποπτωτικών κυττάρων^{34,35} και ρύθμισης του κολλαγόνου και των μεταλλοπρωτεασών της θεμέλιας ουσίας.^{36,37} Μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι πολλές λειτουργίες του SP-A καταστέλλονται κατά την οξειδωση³⁸⁻⁴¹ ή τη νίτρωση.⁴²⁻⁴⁵ Πρόσφατα, αποδείξαμε ότι η οξειδωση του SP-A αυξήθηκε ταχύτατα μετά από έκθεση σε όζον και μάλιστα πριν από την οξειδωση άλλων πρωτεϊνών.¹⁴ Επίσης, δείξαμε ότι με την προοδευτική γήρανση των ποντικών, ο SP-A υφίσταται δυσανάλογα αυξημένη καρβονυλίωση συγκριτικά με άλλες πρωτεΐνες του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL), γεγονός που υποδηλώνει αυξημένη ευπάθειά του στην οξειδωση.⁴⁶ Θεωρήσαμε ότι αφενός η δυσλειτουργία αυτή ενδέχεται να οφείλεται σε οξειδωση και, αφετέρου, λόγω της προαναφερθείσας ευπάθειας, ο SP-A μπορεί να συμμετέχει στον περιορισμό της ιστικής βλάβης μέσω εξουδετέρωσης των RONS.¹⁴

Η οξεία πνευμονική βλάβη έχει φανεί ότι μεταβάλλει τα επίπεδα της επιφανειοδραστικής ουσίας στο BAL, αλλά οι υπεύθυνοι μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί, καθώς έχουν διαπιστωθεί τόσο αυξημένα όσο και μειωμένα επίπεδα φωσφολιπιδίων μετά από επαφή με LPS.^{16,47-49} Τα λιπίδια της επιφανειοδραστικής ουσίας, αν και είναι κυρίως υπεύθυνα για τη μείωση της επιφανειακής τάσης, μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των ανοσιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα, καταστέλλουν την ενεργοποίησή τους και αναστέλλουν την παραγωγή και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών.^{50,51} Παρόλα αυτά, όπως και ο SP-A, μπορούν να οξειδωθούν

από το όζον ή από ενδογενείς RONS,^{39,40,44,52-55} με αποτέλεσμα την τροποποίηση της δράσης τους και πιθανότατα τη συμμετοχή τους στη φλεγμονή που προκαλείται μετά από έκθεση σε όζον.

Έχουμε δείξει παλαιότερα ότι η έκθεση σε όζον συσχετίζεται με μεταβολές της φυσικής ανοσίας και με φλεγμονώδεις διεργασίες, τόσο σε ποντικούς ΚΟ όσο και σε άγριου τύπου (WT). Ωστόσο, παρατηρήσαμε ορισμένες διαφορές μεταξύ των δύο τύπων ποντικών, οι οποίες υποδηλώνουν ότι ο SP-A ενδέχεται να παίζει κάποιο ρόλο ως πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Είναι γνωστό ότι η βλάβη ή η ανοσιακή απάντηση που προκαλείται από συνδυασμό τοξικών παραγόντων δεν μπορεί να προβλεφθεί από την εκτίμηση της επίδρασης κάθε τοξικού παράγοντα μεμονωμένα. Με βάση αυτό το δεδομένο, η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της χορήγησης χαμηλής δόσης LPS πριν από έκθεση σε όζον ποντικών οι οποίοι διέθεταν ακέραιη άμυνα (WT) και ποντικών SP-A ΚΟ, δηλαδή ποντικών από τους οποίους έχει εξαλειφθεί ο φυσικός αμυντικός παράγοντας SP-A. Στόχος μας ήταν η διαπίστωση αν τα πειραματόζωα που έλαβαν χαμηλή ποσότητα LPS αρκετές ώρες πριν την έκθεση στο όζον είχαν ευαισθητοποιηθεί, μέσω τροποποίησης της απάντησής τους στο οξειδωτικό στρες που παράγεται από το τοξικό όζον. Εστίασαμε στα πρώιμα αποτελέσματα, τα οποία παρατηρήθηκαν μέσα σε 4 ώρες από τη χορήγηση όζοντος, χρονικό όριο στο οποίο είχαν διαπιστωθεί σημαντικές μεταβολές σε πολλά σχετικά τελικά σημεία, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες.¹⁴

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια WT ελεύθερα παθογόνων και αρσενικά ποντίκια SP-A ΚΟ στο γενετικό υπόστρωμα C57BL/6. Οι ποντικοί WT προήλθαν από τα εργαστήρια Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME), ενώ παρέμειναν υπό καθορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες στα εκτροφεία του Penn State College of Medicine. Οι ποντικοί ΚΟ διατηρήθηκαν ελεύθεροι παθογόνων σε ειδικό χώρο υπό αποστειρωμένες συνθήκες, στις ίδιες εγκαταστάσεις. Και οι δύο τύποι ποντικών σιτίζονταν ελεύθερα με ειδική τροφή για τρωκτικά και με νερό βρύσης. Το σωματικό τους βάρος κυμαινόταν μεταξύ 20-25 g. Η μελέτη έλαβε έγκριση από την επιτροπή Institutional Animal Care and Use Committee του Penn State College of Medicine.

Ανταπόκριση στη δόση LPS

Οι αρσενικοί ποντικοί WT ηλικίας 5-6 εβδομάδων (n = 4 ποντικοί/χρονικό σημείο) έλαβαν μια εφάπαξ δόση (0,2, 0,5, 1, 2, 50, ή 200 ng) επεξεργασμένης LPS (*Escherichia coli* 055:b5; Sigma, St. Louis, MO) σε 50 μl φυσιολογικού ορό ενδοφαρυγγικά. Παράλληλα, οι ποντικοί της ομάδας ελέγχου έλαβαν ίσο όγκο φυσιολογικού ορού ενδοφαρυγγικά. Και οι δύο όγκοι εγχύθηκαν στο φάρυγγα των αναισθητοποιημένων ποντικών, οι οποίοι τα εισέπνευσαν, ενώ στη συνέχεια ανένησαν από την αναισθησία χωρίς εμφανή συμπτώματα νόσησης. Σύμφωνα με τα ευρήματα από τον τύπο WT, δύο χαμηλές δόσεις LPS που βρέθηκαν να έχουν διεγερτική επίδραση στη φλεγμονή επιλέχθηκαν για μελέτη και στον τύπο ΚΟ. Οι ποντικοί ΚΟ ηλικίας 5-6 εβδομάδων (n = 4 ποντικοί/χρονικό σημείο) έλαβαν μια εφάπαξ δόση LPS (0,5 ή 2 ng/ποντικός/50 μl φυσιολογικού ορού). Οι ποντικοί της ομάδας ελέγχου έλαβαν ίσο όγκο φυσιολογικού ορού ενδοφαρυγγικά. Όλα τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν 20 ώρες μετά τη χορήγηση LPS με αφαίμαξη, μετά από αναισθητοποίηση με αλοθάνη. Το χρονικό όριο των 20 ωρών επιλέχθηκε σύμφωνα με στοιχεία από έναν αριθμό δημοσιευμένων μελετών, οι οποίες διαπίστωσαν την εγκατάσταση βλάβης επαγόμενης από LPS μέσα σε 24 ώρες από τη χορήγησή της.⁵⁶⁻⁵⁸ Από όλους τους πνεύμονες απομονώθηκε το BAL με φυσιολογικό ορό.

Χορήγηση LPS ακολουθούμενη από έκθεση σε όζον

Για τα επόμενα πειράματα επιλέχθηκε η δόση των 2 ng, καθώς συνδυάζει την χαμηλή συγκέντρωση LPS με την επίδραση σε πολλές εκβάσεις. Ποντικοί WT και ΚΟ ηλικίας 5-6 εβδομάδων (20-25 g) (n = 4 ποντικοί/χρονικό σημείο) έλαβαν μια εφάπαξ δόση LPS (2 ng) σε 50 μl φυσιολογικού ορού, ενώ παράλληλα οι ποντικοί της ομάδας ελέγχου έλαβαν ίσο όγκο φυσιολογικού ορού ενδοφαρυγγικά. Δεκατρείς ώρες μετά τη χορήγηση LPS, τα πειραματόζωα εκτέθηκαν σε διηθημένο αέρα (filtered air, FA) ή σε 2 ppm όζοντος για 3 ώρες. Και τα δύο πειράματα πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα σε θερμοκρασία δωματίου με επίπεδα υγρασίας 50%.¹⁴ Εν συντομία, οι 4 ποντικοί τοποθετήθηκαν αρχικά σε γυάλινα δοχεία με συρμάτινα πώματα και στη συνέχεια σε ένα κλειστό γυάλινο θάλαμο. Χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα παραγωγής όζοντος, το οποίο αποδίδει με μεγάλη αποτελεσματικότητα συγκεντρώσεις όζοντος μεταξύ 0,1 ppm και 10 ppm.⁵⁹ Η παραγωγή του έγινε από έναν οζονιστή ηλεκτρικής εκκένωσης (Model OZ25S-SS, Ozotech, Yreka, CA) και η συγκέντρωσή του παρακολουθή-

θηκε με έναν αναλυτή όζοντος υπεριώδους ακτινοβολίας (Model 400A, Advanced Pollution Instrumentation, San Diego, CA). Τέσσερις ώρες μετά τη λήξη της έκθεσης, οι ποντικοί θυσιάστηκαν (συνολικός χρόνος 20 ώρες μετά τη χορήγηση LPS) με αφαίμαξη μετά από αναισθητοποίηση. Στη συνέχεια, από τους πνεύμονες απομονώθηκε το BAL με φυσιολογικό ορό.

Κυτταρολογικές μετρήσεις και βιοχημικές αναλύσεις στο υγρό BAL

Το BAL απομονώθηκε με ενστάλαξη στον πνεύμονα όγκου ίσου με το 80% της ζωτικής του χωρητικότητας για τρεις συνεχόμενες φορές (συνολικά 1,5 ml), μέσω ενδο-τραχειακού καθετήρα. Ο όγκος παραγόμενου υγρού ήταν συνολικά 90% του χρησιμοποιούμενου και δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων μελέτης και ελέγχου. Το υγρό BAL φυγοκεντρήθηκε (150 x g, 5 min, 4 °C) και το ίζημα μετατράπηκε ξανά σε εναιώρημα με διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9%. Ακολούθησε κυτταρολογική μέτρηση σε κυτταρομετρητή αίματος και φυγοκέντρηση για τη διάκριση των κυτταρικών τύπων. Το ελεύθερο κυττάρων υπερκείμενο υγρό ψύχθηκε στους - 80 °C για περαιτέρω βιοχημικές αναλύσεις. Η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία Micro BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Για τον προσδιορισμό των ολικών φωσφολιπιδίων, 100 μl υπερκείμενου υποβλήθηκαν σε λυοφιλοποίηση και στη συνέχεια στη δοκιμασία ποσοτικού προσδιορισμού Phospholipids B Assay (WAKO Chemicals Inc, Richmond, VA).

ELISA κυτταροκινών

Οι συγκεντρώσεις MCP-1 και MIP-2 προσδιορίστηκαν σε δείγματα BAL ελεύθερα κυττάρων με τη χρήση κυτίων ενζυμικής ανοσοπροσροφητικής μεθόδου (ELISA), τα οποία διατίθενται στο εμπόριο (R&D systems, McKinley Place, NE). Τα όρια ανίχνευσης αυτών των κυτίων είναι 1,5 pg/ml για την MIP-2 και 2 pg/ml για την MCP-1. Συνοπτικά, 500 μl BAL ελεύθερου κυττάρων λυοφιλοποιήθηκαν και στη συνέχεια αναμίχθηκαν με το διαλύτη του κυτίου σε τελικό όγκο 100 μl. Η δοκιμασία διενεργήθηκε σύμφωνα με τις συστάσεις των κατασκευαστών. Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm με τη συσκευή SPECTRA Fluor Plus ELISA plate reader (Tecan US, Research Triangle Park, NC).

Ανοσοαποτύπωση του SP-A

Τα επίπεδα SP-A στο BAL προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης dot blot. Συγκεκριμένα,

έγινε αραίωση 25 μl υγρού BAL ελεύθερου κυττάρων σε 975 μl διαλύματος TBS 0,02 M με pH 7,5. Το δείγμα κλασματοποιήθηκε ανά 200 μl και κάθε κλάσμα τοποθετήθηκε σε κατάλληλο μέσο μεταφοράς Bio-Rad Trans Blot (νιτροσελλουλόζη, 0,45 μm) υπό συνθήκες κενού αέρος και σε συσκευή dot blot 96 θέσεων (Bio-Rad, Hercules, CA). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου/ καλίου 0,01 M (PBS, pH 7,2), το οποίο περιείχε 1% βόεια λευκωματίνη ορού (BSA). Κατόπιν, τα δείγματα επώαστηκαν με πολυκλωνικά IgG anti-SP-A αντισώματα κονίκλου (1: 10.000)⁶⁰ σε διάλυμα PBS με 1% BSA και 0,05% Tween-20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις επί 10 λεπτά με PBS και 0,5% Tween-20. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων με δεύτερο αντίσωμα (συζευγμένο με HRP αντίσωμα IgG εριφίου, 1:25.000) (Bio-Rad) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εκπλύθηκε όπως προηγουμένως. Η πρόσδεση του αντισώματος ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Συγκεκριμένα, τα δείγματα επώαστηκαν με 10 ml κάθε διαλύματος ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) για 1 λεπτό και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν μέσα σε φάκελο σελλοφάνης, αφαιρέθηκε η περίσσεια διαλύματος και φωτογραφήθηκαν σε φιλμ Kodak X-Omat XAR (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). Μετά την εμφάνιση του φιλμ, έγινε ποσοτικοποίηση των επιπέδων SP-A με laser πυκνομετρία.

Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών στο BAL

Η ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το OxyBlot Oxidized Protein Detection Kit (Intergen, Purchase, NY), σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως,¹⁴ μετά από ορισμένες τροποποιήσεις. Το κυτίο αυτό ανιχνεύει καρβονυλικές ομάδες τις οποίες απέκτησαν οι πρωτεΐνες με την οξείδωσή τους. Συνοπτικά, σε δείγματα BAL 25 μl προκλήθηκε αποδιάταξη των πρωτεϊνών, με προσθήκη ίσου όγκου SDS 12%. Τα παράγωγα των πρωτεϊνών προέκυψαν μετά από επώαση με 2,5 μl διαλύματος 10x2, 4-δινιτριφαινυλδραζίνης (DNPH) επί 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση διεκόπη με προσθήκη 25 μl διαλύματος εξουδετέρωσης. Ακολούθησε dot blot ανάλυση των δειγμάτων, κατά την οποία τα κλάσματα που περιείχαν πρωτεΐνες παραγόμενες από DNPH αραιώθηκαν σε όγκο 500 μl με διάλυμα PBS 0,01 (pH 7,2) και από αυτά, κλάσματα 200 μl υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση νιτροσελλουλόζης, όπως προηγουμένως. Η ανοσοανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, αν και τα δύο αντισώματα

χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις μειωμένες κατά 50% από τις συνιστώμενες. Εφαρμόστηκε η ίδια μέθοδος ECL για την εμφάνισή τους σε φιλμ XAR και ακολούθησε ποσοτικοποίηση με laser πυκνομετρία.

Οξειδωμένη και μη οξειδωμένη SP-A πρωτεΐνη στο BAL με τη μέθοδο Western Blot

Εν συντομία, κλάσματα 200 μl από τα δείγματα BAL συμπυκνώθηκαν με λυοφιλοποίηση και οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη SDS πολυακρυλαμιδίου 12,5%. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκε δύο φορές για κάθε δείγμα και οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροσελλουλόζης (0,45 μm) για ανίχνευση του SP-A και σε μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF) (Millipore, Bedford, MA) για ανίχνευση του οξειδωμένου SP-A, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris base, 192 mM γλυκίνης και 20% μεθανόλης. Ακολούθησε ανοσοανίχνευση του SP-A, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα. Επίσης, ανιχνεύθηκε η οξειδωμένη πρωτεΐνη SP-A, με ορισμένες τροποποιήσεις σε σχέση με την προηγούμενη περιγραφή.⁶¹ Συγκεκριμένα, η μεμβράνη υπέστη αφυδάτωση για 1 λεπτό με 100% μεθανόλη και στη συνέχεια εκπλύθηκε με διάλυμα Tris 0,02 M (pH 7,5) με 20% μεθανόλη για 5 λεπτά και με 2 N υδροχλωρικού οξέος (HCl) για 5 λεπτά. Κατόπιν, επώαστηκε με 100 μg DNP/μl σε 2 N HCl για 5 λεπτά. Ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με 2 N HCl, 7 εκπλύσεις με 100% μεθανόλη και μια έκπλυση με 0,02 M TBS (διάρκεια κάθε έκπλυσης 5 λεπτά). Η μεμβράνη διατηρήθηκε σε κατάλληλο γαλακτωματοποιημένο διάλυμα 5% (powdered milk, Carnation) σε 0,02 M TBS και 0,05% Tween-20 για όλη τη διάρκεια της νύκτας. Όλα τα στάδια μετά τη μεταφορά των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε 100 ml διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως.

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι αναλύσεις για το γραμμικό πρότυπο τάσης ανάμεσα στη δόση και την κύρια έκβαση, καθώς και μη παραμετροποιημένες συγκρίσεις, πραγματοποιήθηκαν με το SAS V9.1 (SAS Institute, Cary, NC) και κάθε τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Πριν την ανάλυση, οι δόσεις LPS μετατράπηκαν σε λογαριθμική κλίμακα, ώστε να ικανοποιείται η υπόθεση κατανομής που σχετίζεται με το γραμμικό πρότυπο. Όλα τα υπόλοιπα στοιχεία αναλύθηκαν με τη δοκιμασία t (Sigma Stat, SPSS; Chicago, IL).

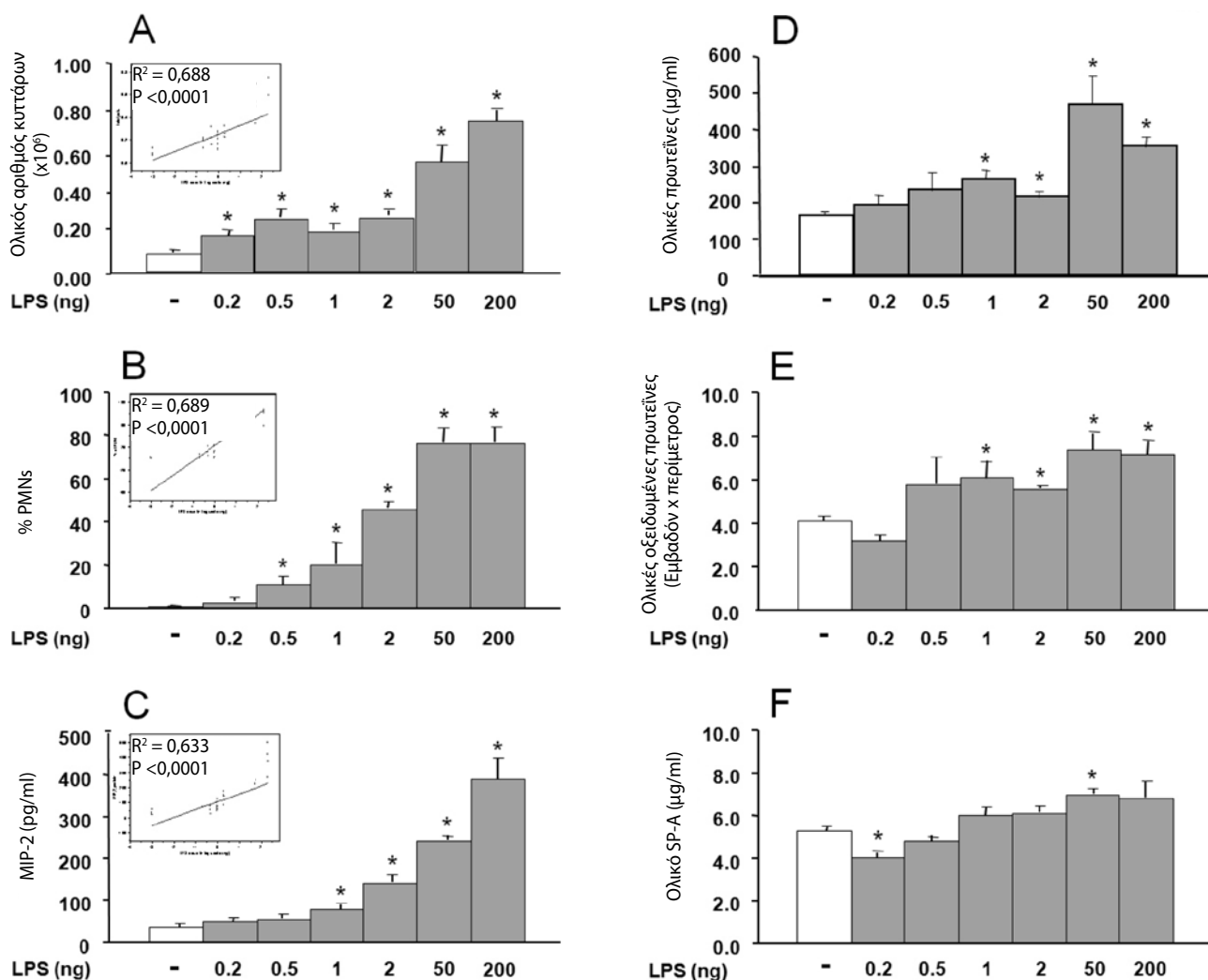
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρατηρήσεις σχετικά με τη συμπεριφορά

Τόσο οι WT όσο και οι KO ποντικοί, οι οποίοι εκτέθηκαν στις διάφορες δόσεις LPS, διαπιστώθηκε ότι είχαν παρόμοια συμπεριφορά με αυτούς που έλαβαν φυσιολογικό ορό. Ωστόσο, οι ποντικοί που έλαβαν χαμηλή δόση LPS ακολουθούμενη από έκθεση σε όζον συμπεριφέρονταν διαφορετικά από αυτούς που εκτέθηκαν σε διηθούμενο αέρα (FA). Λίγη ώρα μετά την έναρξη της έκθεσης σε όζον, το τρίχωμα των ζώων ανορθώθηκε. Ύστερα από 30 λεπτά έως 12 ώρα, τα ποντίκια έγιναν αδρανή, κουλουριάστηκαν και φάνηκε ότι αποκοιμήθηκαν για το υπόλοιπο χρονικό διάστημα της δοκιμασίας. Μετά την έκθεση, η δραστηριότητά τους επανήλθε μέσα σε 1 ώρα. Αντίθετα, οι ποντικοί που εκτέθηκαν σε LPS και FA παρέμειναν δραστήριοι καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης.

Μελέτη ανταπόκρισης στη δόση LPS για τους ποντικούς WT

Η χορήγηση LPS και η μετέπειτα ανάλυση του BAL ανέδειξε πολλαπλές μεταβολές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που έλαβε φυσιολογικό ορό (Εικ. 1). Αυτές περιλαμβάνουν σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) στο συνολικό αριθμό κυττάρων του BAL (Εικ. 1A), στο ποσοστό πολυμορφοπύρηνων (PMNs) (Εικ. 1B) και στα επίπεδα της MIP-2 πρωτεΐνης (Εικ. 1C), σε κάθε τελικό σημείο για δόσεις LPS $\geq 0,2$ ng, $\geq 0,5$ ng και ≥ 1 ng, αντίστοιχα. Ο αριθμός ολικών πρωτεϊνών (Εικ. 1D) και ο βαθμός οξειδωσής τους (Εικ. 1E), υπολογιζόμενος από την περιεκτικότητα των ολικών οξειδωμένων πρωτεϊνών σε καρβονυλικές ομάδες, ήταν επίσης υψηλότεροι στους ποντικούς που έλαβαν LPS και μάλιστα με στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) σε δόσεις LPS 1 ng και υψηλότερες. Τα επίπεδα του SP-A στο BAL, υπολογιζόμενα με dot blot, παρέμειναν φυσιολογικά στις περισσότερες δόσεις, ενώ μειώθηκαν και αυξήθηκαν σε δόση 0,2 και 50 ng, αντίστοιχα (Εικ. 1F). Δεν διαπιστώθηκε σταθερή μεταβολή του αριθμού των ολικών φωσφολιπιδίων σε καμία δόση LPS (δεν απεικονίζεται). Η δόση LPS (Εικ. 1A, 1B, 1C) συσχετίστηκε θετικά με τις παρατηρούμενες αυξήσεις στον αριθμό ολικών κυττάρων ($r^2 = 0,688$, $p < 0,0001$), στο ποσοστό PMNs ($r^2 = 0,689$, $p < 0,0001$) και στα επίπεδα της πρωτεΐνης MIP-2 ($r^2 = 0,633$, $p < 0,0001$). Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με τις άλλες παραμέτρους.

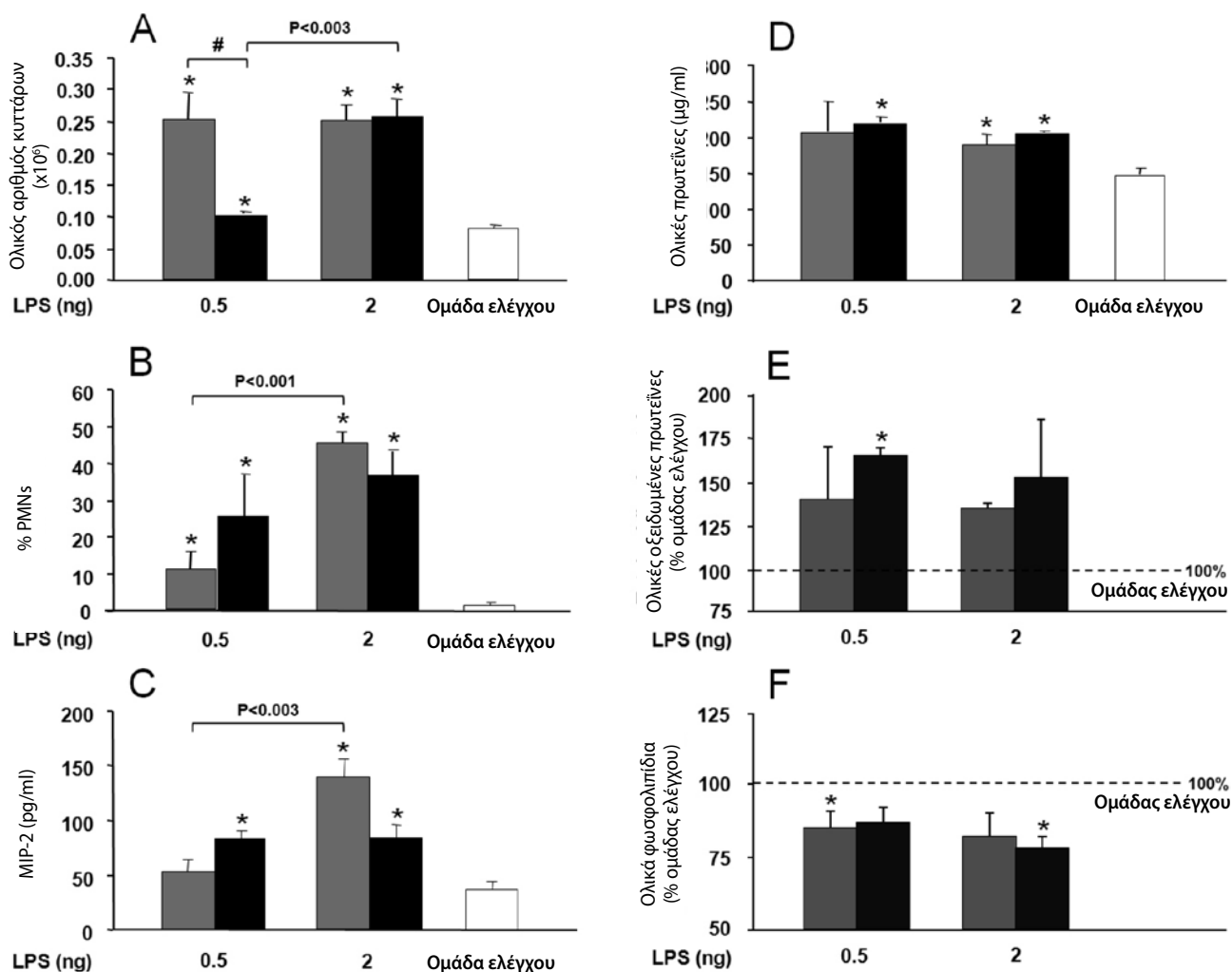


ΕΙΚΟΝΑ 1. Επίδραση της LPS στον ολικό αριθμό κυττάρων και αριθμό PMN, περιεκτικότητα σε MIP-2, ολικές και ολικές οξειδωμένες πρωτεΐνες και ολικό SP-A στο BAL ποντικών WT. Στους ποντικούς χορηγήθηκαν ενδοφάρυγγα διαφορετικές συγκεντρώσεις LPS (0,2, 0,5, 1, 2, 50, και 200 ng) σε 50 μl φυσιολογικού ορού. Οι ποντικοί της ομάδας ελέγχου έλαβαν παράλληλα 50 μl φυσιολογικού ορού. Ακολούθησε συλλογή του BAL, 20 ώρες μετά τη χορήγηση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD (standard deviation, τυπική απόκλιση) για τα ολικά κύτταρα (A), τα PMNs (B), την MIP-2 (C), τις ολικές πρωτεΐνες (D), τις ολικές οξειδωμένες πρωτεΐνες (E) και τον ολικό SP-A (F). Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ της ομάδας που έλαβε LPS (γκρι στήλες) και της ομάδας ελέγχου (λευκή στήλη) ($n = 4$ για κάθε ομάδα) υποδηλώνονται με αστερίσκο (*). Στο κουτί αναγράφεται η συσχέτιση μεταξύ της δόσης LPS και των αποτελεσμάτων.

Σύγκριση της επίδρασης της LPS στους ποντικούς WT και KO

Το BAL από ποντικούς KO, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός ή LPS (0,5 ng ή 2,0 ng/ ποντικός), εμφάνισε σημεία φλεγμονής μετά από τη χορήγηση LPS (Εικ. 2). Μεταξύ των δύο ομάδων που έλαβαν LPS ή φυσιολογικό ορό διαπιστώθηκαν αρκετές διαφορές σε πολλά τελικά σημεία και για τις δύο δόσεις LPS (Εικ. 2Α-2D). Οι τιμές

αναφοράς για τις ολικές οξειδωμένες πρωτεΐνες (Εικ. 2Ε) και για τα ολικά φωσφολιπίδια (Εικ. 2F) διέφεραν μεταξύ τους, για το λόγο αυτό ως τιμή αναφοράς ορίστηκε το 100% και τα δείγματα LPS υπολογίστηκαν ως εκατοστιαίο ποσοστό αυτής. Τα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών αυξήθηκαν μετά τη χορήγηση LPS και μάλιστα διαπιστώθηκε μια τάση για μεγαλύτερη αύξηση στους ποντικούς KO, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική μόνο σε δόση 0,5 ng LPS. Τα επίπεδα των φωσφολιπιδίων μειώθηκαν



ΕΙΚΟΝΑ 2. Επίδραση της LPS στον ολικό αριθμό κυττάρων και αριθμό PMN, περιεκτικότητα σε MIP-2, ολικές και ολικές οξειδωμένες πρωτεΐνες και ολικά φωσφολιπίδια σε BAL ποντικών KO, καθώς και σύγκριση με τον τύπο WT. Στους ποντικούς εγχύθηκαν ενδοφάρυγγα επιλεγμένες δόσεις LPS (0,5 ng και 2 ng) σε 50 μl φυσιολογικού ορού. Οι ποντικοί της ομάδας ελέγχου έλαβαν παράλληλα 50 μl φυσιολογικού ορού. Ακολούθησε συλλογή του BAL, 20 ώρες μετά τη χορήγηση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ SD. ($n = 4$) για τον τύπο WT (γκρι στήλες) και KO (μαύρες στήλες). Στις περιπτώσεις που δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των τύπων WT και KO (διαγράμματα A, B, C, D), αναφέρονται οι τιμές αναφοράς της ομάδας FA στη λευκή στήλη. Στα διαγράμματα E και F, όπου παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο τύπων ποντικών, ως τιμή αναφοράς θεωρήθηκε το 100% (στικτή γραμμή). Τα στοιχεία αναφέρονται σε ολικά κύτταρα (A), ποσοστό PMNs (B), MIP-2 (C), ολικές πρωτεΐνες (D), ολικές οξειδωμένες πρωτεΐνες (E) και ολικά φωσφολιπίδια (F). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ της ομάδας που έλαβε LPS και της ομάδας ελέγχου υποδηλώνονται με αστερίσκο (*), ενώ μεταξύ των τύπων WT και KO υποδηλώνονται με το σύμβολο (#). Οι διαφορές ανάμεσα στις δόσεις LPS στους ποντικούς WT ή KO αντιπροσωπεύονται με μια συνδετική γραμμή, πάνω από την οποία αναγράφεται η τιμή p .

και παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα στη δόση των 0,5 ng LPS για τους ποντικούς WT και στη δόση των 2 ng LPS για την ομάδα KO.

Από τη σύγκριση των στοιχείων των ομάδων KO και WT προέκυψαν οι ακόλουθες διαφορές:

1) Ο συνολικός αριθμός κυττάρων (Εικ. 2A) διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων στα 0,5 ng LPS, αλλά δεν υπήρξε

στατιστικά σημαντική διαφορά στα 2 ng LPS. Η διαφορά αυτή υποδηλώνει αδυναμία των ποντικών KO να ανταποκριθούν άμεσα στα χαμηλά επίπεδα LPS, η οποία όμως εξαλείφεται μετά από μια ισχυρότερη προσβολή (όπως από 2 ng LPS). 2) Η επιστράτευση των PMNs στο BAL, υπολογιζόμενη ως ποσοστό PMNs (Εικ. 2B) είναι σταδιακή στα ποντίκια WT, ενώ διαπιστώθηκαν στατιστικά

σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο δόσεων LPS, αλλά και σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα ΚΟ δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 δόσεων LPS, αν και η συσσώρευση των PMNs ήταν αυξημένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παρόμοιο πρότυπο μεταβολής με αυτό των PMNs ακολούθησε και η μείωση του ολικού αριθμού μακροφάγων/ μονοκυττάρων στις δύο ομάδες (δεν απεικονίζεται). 3) Τα επίπεδα MIP-2 (Εικ. 2C) κάθε ομάδας, στο μεγαλύτερο μέρος της μελέτης, εμφάνιζαν παράλληλη τάση με τα επίπεδα των PMNs, με τη διαφορά ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της δόσης 0,5 ng LPS και της ομάδας ελέγχου στα ποντίκια WT. Στο σύνολό τους οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η απάντηση των ΚΟ στα χαμηλά επίπεδα LPS είναι περιορισμένη. 4) Αναφορικά με την πρωτεΐνη BAL (Εικ. 2D), αν και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ποντικών WT και ΚΟ στις ολικές πρωτεΐνες, υπήρξε τάση εντονότερων μεταβολών στις ολικές οξειδωμένες πρωτεΐνες στους ποντικούς ΚΟ έναντι των WT. 5) Παρόμοια, διαπιστώθηκε μείωση των ολικών φωσφολιπιδίων (Εικ. 2F) μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας μελέτης, αλλά όχι μεταξύ των ποντικών WT και ΚΟ.

Επίδραση του όζοντος ή του FA στα κύτταρα του BAL και στις κυτταροκίνες σε ποντικούς WT και ΚΟ που έλαβαν LPS

Η έκθεση των ποντικών WT σε LPS (2 ng) + όζον είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές αυξήσεις ($p < 0,05$) σε πολλές παραμέτρους (Εικ. 3), σε σύγκριση με την έκθεση σε LPS + FA. Αυτές περιλαμβάνουν σημαντικές μεταβολές του ολικού αριθμού κυττάρων (Εικ. 3A), των επιπέδων MIP-2 (Εικ. 3C) και MCP-1 (δεν απεικονίζεται), των ολικών πρωτεϊνών (Εικ. 3D) και των ολικών οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 3E) στα δείγματα BAL. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων στο ποσοστό PMN (Εικ. 3B) ή στα φωσφολιπίδια (Εικ. 3F).

Η έκθεση των ποντικών ΚΟ σε LPS (2 ng) + όζον προκάλεσε, σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε LPS + FA, σημαντικές αυξήσεις ($p < 0,05$) στα επίπεδα των MIP-2 (Εικ. 3C) και MCP-1 (δεν απεικονίζεται), των φωσφολιπιδίων (Εικ. 3F), των ολικών πρωτεϊνών (Εικ. 3D) και των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 3E). Το πρότυπο απάντησης στην LPS ήταν παρόμοιο με το παρατηρούμενο στους ποντικούς WT, με εξαίρεση τη σημαντική αύξηση των φωσφολιπιδίων στην ομάδα ΚΟ μετά από χορήγηση LPS + όζοντος, χωρίς μεταβολή του ολικού αριθμού κυττάρων, συγκριτικά με την έκθεση σε LPS + FA.

Ωστόσο, σημαντικές αλλαγές διαπιστώθηκαν μεταξύ των ποντικών WT και ΚΟ μετά από έκθεση σε LPS + όζον ως προς το ποσοστό PMN (Εικ. 3B), MIP-2 (Εικ. 3C) και φωσφολιπιδίων (Εικ. 3F). Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές μεταξύ των δύο τύπων ποντικών στα επίπεδα MCP-1 (δεν απεικονίζεται), ολικών πρωτεϊνών (Εικ. 3D) και ολικών οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 3E). Μετά την έκθεση σε LPS + FA, διαφορές μεταξύ των ποντικών WT και ΚΟ παρατηρήθηκαν μόνο στον ολικό αριθμό κυττάρων (Εικ. 3A).

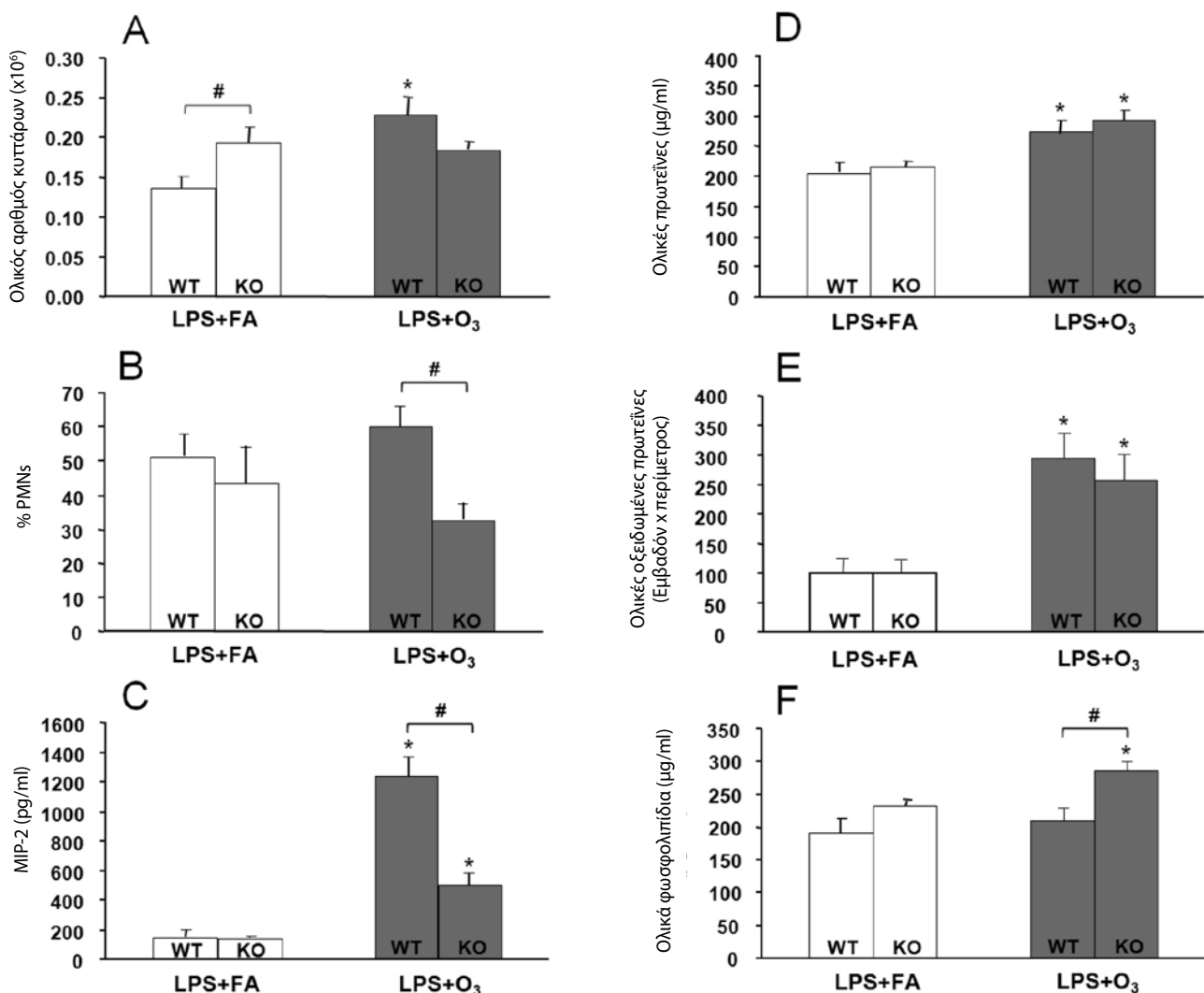
Επίδραση της έκθεσης σε LPS και όζον στα επίπεδα SP-A και οξειδωμένου SP-A

Μετά από έκθεση σε LPS + FA παρατηρήθηκε μικρή αλλά σημαντική αύξηση της ολικής περιεκτικότητας SP-A, σε σύγκριση με την έκθεση μόνο σε FA (Εικ. 4A). Παρόμοιες αυξήσεις παρατηρήθηκαν μετά από το συνδυασμό LPS + όζοντος συγκριτικά με μόνο όζον, υποδηλώνοντας πως ο υπεύθυνος παράγοντας για την αύξηση αυτή είναι η LPS. Η ανάλυση των επιπέδων οξειδωμένου SP-A αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στη διμερή μορφή του SP-A μετά από έκθεση σε όζον και σε LPS + όζον (Εικ. 4B). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της χορήγησης LPS + FA και μόνο FA, υποδηλώνοντας ότι οι μεταβολές στην οξείδωση του SP-A οφείλονται κύρια στην έκθεση στο όζον.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρόσφατα, αναφέραμε¹⁴ ότι το BAL από ποντικούς WT και ΚΟ με όμοιο γενετικό υπόβαθρο παρουσιάζει σημεία φλεγμονής μετά από έκθεση σε όζον (2 ppm) για 3 ή 6 ώρες. Στον τύπο ΚΟ, πολλές παράμετροι της φλεγμονώδους απάντησης ήταν λιγότερο έκδηλες, γεγονός το οποίο αποδόθηκε στην απουσία SP-A από το κυψελιδικό μακροφάγο, η οποία το καθιστά λιγότερο ικανό να πυροδοτήσει μια αποτελεσματική φλεγμονώδη απάντηση. Επιπλέον, μια άλλη ομάδα ερευνητών αναφέρει ότι η εισπνοή μεγάλης δόσης LPS (100 μg) πριν από έκθεση των ποντικών WT σε όζον φάνηκε ότι ευαισθητοποίησε διαφορετικά τα πειραματόζωα στο όζον στις διάφορες ηλικίες, σε επίπεδο δεικτών φλεγμονής.⁸ Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την υπόθεση ότι οι χαμηλές δόσεις LPS επιδρούν αρνητικά στις φλεγμονώδεις διαδικασίες του πνεύμονα και διαφοροποιούν την επαγόμενη από όζον βλάβη σε ποντικούς με ακέραιη φυσική ανοσία (δηλαδή τύπου WT) και σε ποντικούς με διαταραγμένη φυσική ανοσία (δηλαδή τύπου ΚΟ).

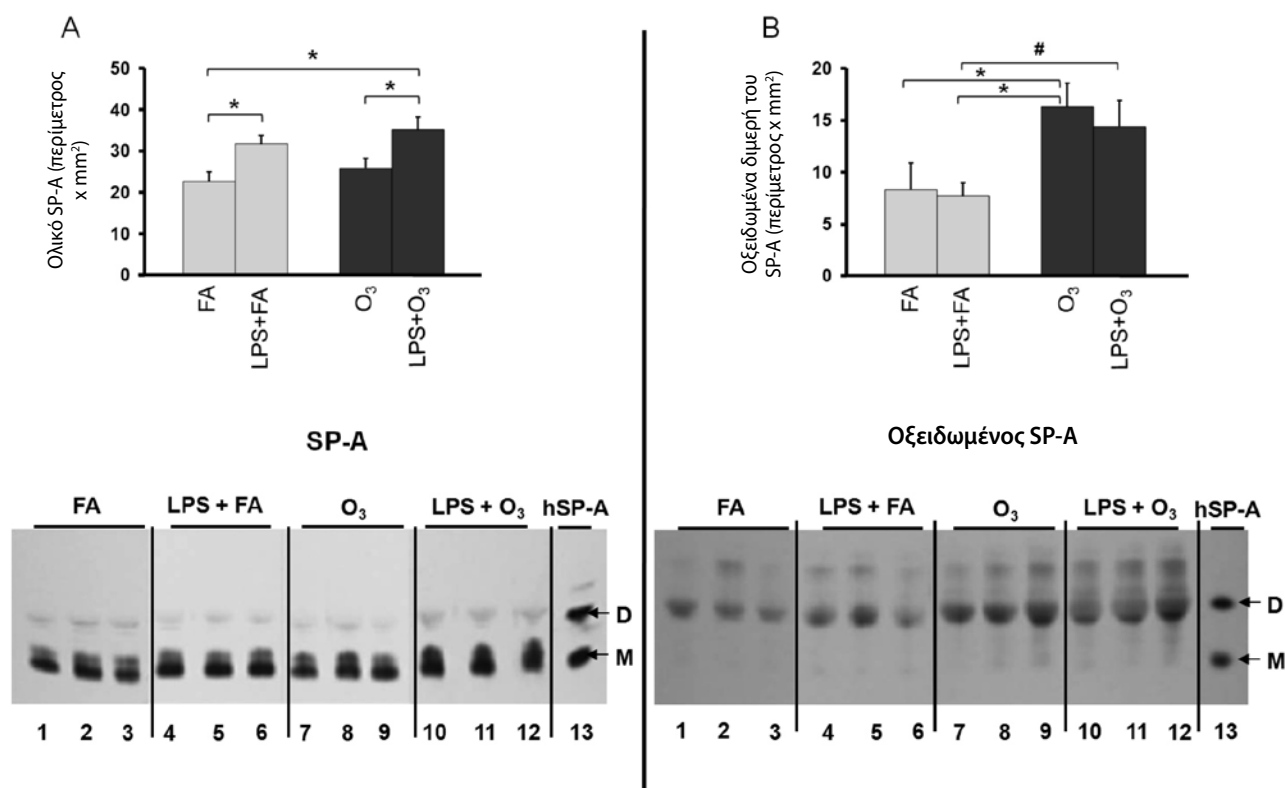
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι: 1) η χαμηλή δόση LPS



ΕΙΚΟΝΑ 3. Επίδραση της έκθεσης σε LPS + FA ή σε LPS + όζον στον ολικό αριθμό κυττάρων και αριθμό PMNs, MIP-2, φωσφολιπίδια, ολικές και ολικές οξειδωμένες πρωτεΐνες, σε BAL ποντικών KO και WT. Οι ποντικοί έλαβαν ενδοφαρυγγικά 2 ng LPS σε 50 μl φυσιολογικού ορού και 13 ώρες αργότερα εκτέθηκαν σε FA ή όζον (2 ppm για 3 ώρες). Το BAL συλλέχθηκε 4 ώρες μετά το τέλος της έκθεσης, ή συνολικά 20 ώρες μετά τη χορήγηση LPS. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SD (n = 4) για την ομάδα LPS + FA (ανοιχτές στήλες) και LPS + όζον (μαύρες στήλες). Τα στοιχεία αναφέρονται σε ολικά κύτταρα (A), ποσοστό PMNs (B), MIP-2 (C). Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ της ομάδας LPS + FA και της ομάδας LPS + όζον υποδηλώνονται με αστερίσκο (*), ενώ μεταξύ των τύπων WT και KO υποδηλώνονται με το σύμβολο (#) ($p \leq 0,05$).

(2 ng) μεταβάλλει την περιεκτικότητα του BAL σε κύτταρα, κυτταροκίνες, ολικές πρωτεΐνες και οξειδωμένες πρωτεΐνες, σε ποντικούς WT 20 ώρες μετά από χορήγηση LPS. 2) παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των τύπων WT και KO μετά από χορήγηση LPS (0,5 ή 2 ng) στον ολικό αριθμό κυττάρων και στο πρότυπο απάντησης της MIP-2, καθώς και στα βασικά επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων. 3) αν 13 ώρες μετά τη χορήγηση LPS (2 ng) ακολουθήσει 3ωρη έκθεση σε όζον, παρατηρού-

νται διαφορές ανάμεσα στους ποντικούς WT και KO ως προς τα PMN, MIP-2 και φωσφολιπίδια. 4) στον τύπο WT παρατηρείται αύξηση του ολικού SP-A μετά από έκθεση σε LPS + FA ή LPS + όζον, αλλά όχι σε απάντηση μόνο σε όζον. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση των διμερών οξειδωμένων SP-A μετά από έκθεση σε όζον ή LPS + όζον, αλλά όχι σε LPS + FA. 5) Η χορήγηση LPS δεν έχει εμφανή επίδραση στη συμπεριφορά, ενώ στην πορεία της έκθεσης σε όζον και οι δύο τύποι ποντικών εμφανίζονται λιγότερο



ΕΙΚΟΝΑ 4. Επίδραση της έκθεσης σε LPS ± όζον, σε όζον, ή μόνο σε FA, στα επίπεδα του SP-A (Διάγραμμα A) και οξειδωμένου SP-A (Διάγραμμα B) σε BAL ποντικών WT. Οι ποντικοί ενδοφάρυγγικά έλαβαν 2 ng LPS σε 50 μl φυσιολογικού ορού και 13 ώρες αργότερα εκτέθηκαν είτε σε FA (γκρι στήλες) ή σε όζον (μαύρες στήλες) (2 ppm για 3 ώρες). Το BAL συλλέχθηκε 4 ώρες μετά την έκθεση ή 20 ώρες μετά τη χορήγηση LPS. Συμπυκνωμένα δείγματα BAL 200 μl υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση γέλης SDS και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες, όπως περιγράφεται στην ενότητα "Μέθοδοι". Τα επίπεδα SP-A (Διάγραμμα A, κορυφή) και οξειδωμένου SP-A (Διάγραμμα B, κορυφή) προσδιορίστηκαν με πυκνομετρία Western blot. $n = 6$ για κάθε ομάδα, εκτός από την ομάδα FA, όπου $n = 5$. Κάτω από τα διαγράμματα απεικονίζεται η αντιπροσωπευτική ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Διάγραμμα A) και οξειδωμένων πρωτεϊνών (Διάγραμμα B). Η στήλη αναφοράς αποτελείται από σημειωμένο ανθρώπινο κυψελιδικό SP-A (hSP-A) με ζώνες μονομερών (M) και διμερών (D) SP-A. Η θέση των επιπέδων διμερών οξειδωμένων SP-A καθορίστηκε μετά από σύγκριση με πανομοιότυπο ανοσοαποτύπωμα με αντιγόνο του SP-A. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή $\pm$ SD. Οι στατιστικές σημαντικές διαφορές ($p \leq 0,05$) μεταξύ της ομάδας LPS + FA και της ομάδας LPS + όζον υποδηλώνονται με το σύμβολο (#), ενώ οι υπόλοιπες συγκρίσεις με έναν αστερίσκο (*).

δραστήριοι. Τα ευρήματα αυτά στο σύνολό τους μας επιτρέπουν τις ακόλουθες υποθέσεις: 1) Η επαφή με χαμηλή δόση LPS μπορεί να έχει μακροπρόθεσμες επιδράσεις στη σύσταση του BAL. 2) Ένα δεύτερο ερέθισμα μπορεί να οδηγήσει σε απρόβλεπτα ευρήματα, συγκριτικά με κάθε ερέθισμα μόνο του, και 3) Ο SP-A έχει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονής.

Οι διαφορές μεταξύ των ποντικών WT και KO σε απάντηση στην LPS είναι μακροπρόθεσμες, καθώς είναι ανιχνεύσιμες 20 ώρες μετά τη χορήγηση LPS και περιορίζονται στον ολικό αριθμό κυττάρων στο BAL και στο πρότυπο της απάντησης της MIP-2. Αν και είναι αδιευκρίνιστος ο λόγος, με βάση τα ευρήματα αυτά υποστηρίζεται η θεωρία

ότι, στον τύπο WT, τα κυψελιδικά κύτταρα και πιθανότατα και τα μακροφάγα μπορούν, ενόψει μιας ασθενούς απειλής (π.χ. 0,5 ng LPS), να επάγουν τη συσσώρευση σημαντικού αριθμού κυττάρων στον κυψελιδικό χώρο, μέσω μικρών και ασήμαντων μεταβολών της έκφρασης της MIP-2. Αντίθετα, το ερέθισμα είναι ισχυρότερο, όπως στην περίπτωση των 2 ng LPS, για τη συσσώρευση αρκετού αριθμού κυττάρων είναι απαραίτητη η αύξηση μορίων όπως της MIP-2, δηλ. ενός χημειοτακτικού παράγοντα των ουδετεροφίλων παραγόμενου από τα μακροφάγα. Ωστόσο, τα κυψελιδικά κύτταρα έχουν διαταραγμένη πρώτη γραμμή άμυνας, όπως πιθανότατα ισχύει στα ποντίκια KO, μια ήπια απειλή (0,5 ng LPS) γίνεται αντιληπτή

ως μεγαλύτερη (δηλαδή 2 ng LPS), με αποτέλεσμα την αύξηση μορίων όπως της MIP-2. Επιπλέον, η αυξημένη παραγωγή MIP-2 στους ποντικούς ΚΟ, σε απάντηση σε ένα ήπιο ερέθισμα, κατέστη αδύνατο να οδηγήσει σε αύξηση των ολικών κυττάρων στον κυψελιδικό χώρο, όπως συμβαίνει στα WT ποντίκια, στα οποία η απάντηση θεωρείται αρκετή για την εξάλειψη της δυνητικής απειλής. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν στο σύνολό τους με την άποψη ότι οι ποντικοί ΚΟ εκφράζουν διαταραγμένη ή και περιορισμένη απάντηση, σε σύγκριση με τους WT. Είναι πιθανό ότι το κυψελιδικό μακροφάγο του ποντικού ΚΟ, αντίθετα με αυτό του WT, δεν είναι επαρκώς προετοιμασμένο για την αποτελεσματική απάντηση στην LPS. Παλαιότερα υποθέσαμε ότι το κυψελιδικό μακροφάγο, σε απουσία SP-A, εκδηλώνει μειωμένη δραστηριότητα επειδή δεν πληρούται από τον SP-A.¹⁸ Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ανεπαρκής φαγοκυττάρωση της *K. Pneumonia*²⁷ από τα ΚΟ κυψελιδικά μακροφάγα, συγκριτικά με του WT, σε πολλές μελέτες με SP-A ΚΟ ποντικούς. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν SP-A ΚΟ ποντικοί ως προς την αδυναμία αντιμετώπισης λοιμώξεων από *P. Aeruginosa*³² και από *streptococcus B*,⁶³ καθώς και την ικανότητα της πρωτεΐνης SP-A να επάγει τη φλεγμονή και να ελαχιστοποιεί την πνευμονική βλάβη και τη θνητότητα μετά από πειραματική μεταμόσχευση μυελού των οστών.^{64,65}

Όταν οι ποντικοί που έλαβαν LPS εκτέθηκαν και σε δεύτερο βλαπτικό ερέθισμα (δηλ. στο όζον), παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των PMNs και της πρωτεΐνης MIP-2 στον τύπο ΚΟ, συγκριτικά με τον WT, μολονότι και στους δύο τύπους σημειώθηκε σημαντική αύξηση της MIP-2 σε σχέση με την ομάδα που έλαβε LPS + FA. Αντίθετα, όταν και οι τύποι ΚΟ και WT εκτέθηκαν σε ένα μόνο ερέθισμα, είτε LPS (2 ng) είτε όζον,¹⁴ δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στα επίπεδα MIP-2 ή PMNs (μόνο στην ομάδα της LPS), αν και ήταν αυξημένα σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες ελέγχου, στις οποίες δεν επέδρασε κανένα ερέθισμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε προηγούμενη μελέτη μας,¹⁴ αν και δεν διαπιστώθηκε διαφορά στην πρωτεΐνη MIP-2 μεταξύ των τύπων WT και ΚΟ μετά από έκθεση σε όζον, η περιεκτικότητα του MIP-2 mRNA ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ποντικούς ΚΟ. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στην υπόθεση ότι η προηγηθείσα επαφή με LPS αυξάνει την έκφραση της MIP-2 μέσω μεταφραστικών ρυθμίσεων. Από την άλλη πλευρά, η έκθεση του ΚΟ ποντικού σε όζον μπορεί να επιδράσει αρνητικά σε μεταμεταγραφικές διαδικασίες που σχετίζονται με την έκφραση της MIP-2. Αυτές οι πιθανότητες είναι δυνατό να ερμηνεύσουν τα χαμηλότερα επίπεδα MIP-2 που παρατηρούνται σε απάντηση στην έκθεση σε LPS + όζον

στον ΚΟ τύπο, σε σχέση με τον WT, υποστηρίζοντας τη συμμετοχή του SP-A στη ρύθμιση της MIP-2.

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με την παλαιότερη μελέτη μας,¹⁴ η μετάφραση της MIP-2 είναι δυνατό να ανασταλεί πλήρως στον ποντικό ΚΟ μετά από έκθεση σε όζον, όπως εκτιμάται από τη διαπίστωση ίσης περιεκτικότητας mRNA στους ποντικούς που εκτέθηκαν σε όζον και στους ΚΟ ποντικούς. Ακόμα, η LPS ή το όζον είναι πιθανό να επιδρούν στην παραγωγή της MIP-2 με διαφορετικούς ή αλληλοεπικαλυπτόμενους μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, στον τύπο WT, η μεταβολή των επιπέδων MIP-2 μετά από συνδυασμένη έκθεση (σε LPS + όζον) ήταν μεγαλύτερη από το άθροισμα των μεταβολών κάθε μεμονωμένου παράγοντα (μόνο LPS ή όζον). Οι τιμές MIP-2 ήταν 36 pg/ml $\pm$ 16 για την ομάδα ελέγχου, 148 pg/ml $\pm$ 38 για την ομάδα που έλαβε LPS και 627 pg/ml $\pm$ 205 για την ομάδα που εκτέθηκε σε όζον (χωρίς προηγούμενη επαφή με LPS).¹⁴ Παρόλα αυτά, μετά από έκθεση σε συνδυασμό LPS και όζον, τα επίπεδα MIP-2 έφτασαν τα 1.234 pg/ml $\pm$ 277, αυξάνοντας την πιθανότητα συνέργειας των δύο παραγόντων. Στον ποντικό ΚΟ φαίνεται ότι υπάρχει περιορισμένη συνέργεια, υποδηλώνοντας ότι ο SP-A συμμετέχει στη ρύθμιση της φλεγμονής και ιδιαίτερα στην παραγωγή της MIP-2.

Στους ποντικούς WT διαπιστώθηκε αυξημένη περιεκτικότητα SP-A μετά από χορήγηση LPS, ενώ αντίθετα δε σημειώθηκε διαφορά μετά από έκθεση σε όζον, παρατήρηση η οποία συμφωνεί με την παλαιότερη μελέτη μας¹⁴ και υποδηλώνει ότι η αύξηση του SP-A σε απάντηση στο συνδυασμό LPS + όζον οφείλεται κατά κύριο λόγο στην LPS. Από την άλλη πλευρά, τόσο στην παρούσα μελέτη όσο και στην προηγούμενη διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα οξειδωμένου SP-A,¹⁴ μετά από έκθεση σε όζον αλλά όχι σε LPS, υποδηλώνοντας ότι το οξειδωτικό στρες που επάγεται από το όζον είναι υπεύθυνο για την αυξημένη περιεκτικότητα οξειδωμένου SP-A, μετά από επίδραση LPS + όζοντος. Συνεπώς, οι διαφορές στα επίπεδα SP-A και οξειδωμένου SP-A, οι οποίες παρατηρούνται μετά από έκθεση σε LPS και όζον, μεμονωμένα ή και σε συνδυασμό, υποδηλώνουν επιπλέον ότι κάθε παράγοντας από τους δύο δρα μέσω διαφορετικού μηχανισμού. Συγκεκριμένα, συμπεραίνεται ότι η LPS επιδρά ποσοτικά στον SP-A, πιθανότατα μέσω παρεμβολής στη ρύθμισή του, ενώ το όζον επιδρά ποιοτικά στον SP-A μέσω αύξησης της οξείδωσης των διμερών μορφών του. Εκ πρώτης όψεως, φαίνεται ότι η LPS και το όζον έχουν διασταυρούμενες δράσεις στον SP-A, καθώς η LPS αυξάνει την παραγωγή και το όζον την οξείδωσή του. Πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, έδειξαν ότι η οξειδωμένη μορφή του SP-A έχει μειωμένη

λειτουργικότητα,^{27,39-41} συνεπώς, ακόμα και αν αυξηθεί η περιεκτικότητά του, η συγκέντρωση του λειτουργικού SP-A ενδέχεται να μην έχει μεταβληθεί στις πειραματικές συνθήκες της μελέτης. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι ο SP-A οξειδώνεται ταχύτερα από τις ολικές πρωτεΐνες του BAL,^{14,46} γεγονός που υποδηλώνει ότι ενδεχομένως αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό έναντι του οξειδωτικού στρες, ο οποίος εξουδετερώνει τις δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου (RONS) και θυσιάζεται στα πλαίσια της αντιοξειδωτικής του δράσης.^{67,68} Σύμφωνα με αυτήν την θεωρία, ο SP-A είναι πιθανό να αποτελεί το μόριο που θα θυσιαστεί λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του στην οξείδωση, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνει τις δραστικές ρίζες αποτρέποντας την οξείδωση άλλων μορίων. Εναλλακτικά, όπως υποθέσαμε παλαιότερα,¹⁴ η οξείδωση των διμερών SP-A μπορεί να είναι σημαντική για τη σηματοδότηση και, επομένως, ορισμένες από τις διαταραχές των ποντικών ΚΟ είναι δυνατό να οφείλονται στην απουσία της επαγόμενης από SP-A σηματοδότησης, υπό συνθήκες στρες. Επιπλέον, σε ποντικούς ΚΟ έχει παρατηρηθεί δυσλειτουργία ανοσιακών κυττάρων, κυρίως των μακροφάγων όσο και ουδετεροφίλων, καθώς και στη ρύθμιση της παραγωγής RONS, υποδηλώνοντας συμμετοχή του SP-A στις διαδικασίες αυτές.^{14,29-31}

Συνοπτικά, από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα. 1) Μία χαμηλή δόση LPS μπορεί να έχει μακροπρόθεσμη επίδραση σε πολλά χαρακτηριστικά του BAL, μεταξύ των οποίων στα κύτταρα, στις κυτταροκίνες, στη συγκέντρωση πρωτεϊνών και πολλά άλλα. 2) Ο SP-A συμμετέχει στις φλεγμονώδεις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα ως απάντηση στην

έκθεση σε LPS και/ή όζον. Η LPS φαίνεται πως επιδρά στη ρύθμιση του SP-A μέσω μεταβολής της ποσοτικής σύστασής του, ενώ το όζον επιδρά στην οξείδωση των διμερών του SP-A μεταβάλλοντάς το ποιοτικά. Το τελευταίο φαινόμενο ενδέχεται να έχει επίπτωση και στη λειτουργία του. 3) Ο SP-A φαίνεται πως παίζει ρόλο στη ρύθμιση της MIP-2, πιθανότατα μέσω της πλήρωσης του κυψελιδικού μακροφάγου και της πρόκλησης κατάλληλης απάντησης σε ένα βλαπτικό ερέθισμα. Η έκθεση σε LPS και όζον τροποποιεί την έκφραση της MIP-2, πιθανότατα μέσω διαφορετικών μηχανισμών. 4) Η έκθεση σε χαμηλή δόση LPS και όζοντος αποκάλυψε ορισμένες απρόσμενες εκβάσεις, οι οποίες δεν παρατηρήθηκαν με κάθε μια μεμονωμένη επίδραση, υποδηλώνοντας ότι οι παράγοντες αυτοί δρουν μέσω διαφορετικών και/ή αλληλοεπικαλυπτόμενων μηχανισμών. Τέλος, τα ευρήματα της μελέτης υποστηρίζουν την άποψη ότι, σε απουσία SP-A, το κυψελιδικό μακροφάγο πιθανότατα αδυνατεί να εκδηλώσει κατάλληλη απάντηση σε βλαπτικούς παράγοντες, συμπεραίνοντας ότι ο SP-A ενδεχομένως συμμετέχει στην επαρκή προετοιμασία ή πλήρωση του μακροφάγου για την εκδήλωση αυτής της απάντησης.

Ευχαριστίες: Οι συγγραφείς ευχαριστούν την Julie Graham για την πληκτρολόγηση του κειμένου. Η παρούσα μελέτη είχε την υποστήριξη του ES0098882 από το National Institute of Environmental Health Sciences.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(Βλέπε αγγλικό κείμενο)

Effect of low doses of lipopolysaccharide prior to ozone exposure on bronchoalveolar lavage

Differences between wild type and surfactant protein A-deficient mice

Rizwanul Haque¹,
Todd M. Umstead¹,
Kwangmi Ahn²,
David S. Phelps¹,
Joanna Floros^{1,3}

¹The Penn State Center for Host defense, Inflammation, and Lung Disease (CHILD) Research, Departments of Pediatrics, ²Public Health Sciences, and ³Obstetrics and Gynecology, Pennsylvania State University College of Medicine, Hershey, PA 17033

Key words:

- polymorphonuclear leukocytes
- cytokines
- lipopolysaccharide
- oxidation
- macrophage
- ozone

Correspondence:

Joanna Floros, Ph.D.
Department of Pediatrics
Pennsylvania State University College of Medicine
P. O. Box 850
Hershey, PA 17033
e-mail: jfloros@psu.edu
Tel: (717) 531-6972
Fax: (717) 531-7667

SUMMARY. BACKGROUND: Several aspects of the inflammatory response to a single insult, i.e., exposure to 2 ppm of ozone (O₃) for 3 h or 6 h, are less pronounced in surfactant protein A deficient (SP-A -/-) mice (KO) than in wild type mice (WT). It was hypothesized that a mild insult, specifically low doses of lipopolysaccharide (LPS), would adversely affect host defense and differentially potentiate O₃-induced injury in WT and KO mice. **METHODS:** WT and KO mice were treated with different doses of LPS or LPS (2 ng) + O₃ (2 ppm) or filtered air (FA) for 3 h, then sacrificed 4 h following exposure (O₃, FA) or 20 h after LPS treatment alone. Several endpoints of inflammation were measured in bronchoalveolar lavage (BAL). **RESULTS:** 1) At 20 h after LPS treatment alone, both WT and KO mice exhibited signs of inflammation, but with differences in the macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) response pattern, total cells (at 0.5 ng LPS) and basal levels of oxidized protein and phospholipids; 2) After LPS + O₃, KO compared to WT showed decrease in polymorphonuclear leukocytes (PMNs) and MIP-2 and increase in phospholipids, and after LPS + FA an increase in total cells; 3) WT after LPS + FA showed an increase in SP-A with no further increase after LPS + O₃, and an increase in oxidized SP-A dimer following O₃ or LPS + O₃. **CONCLUSIONS:** LPS treatment has negative effects on inflammation endpoints in mouse BAL long after exposure and renders KO mice less capable of responding to a second insult. LPS and O₃ affect SP-A, quantitatively and qualitatively, respectively. *Pneumon 2009; 22(2):143–155*

"Duty is liberating. It forces you to transcend your own limitations and makes you do things that may not come naturally, but must be done, because they are right."

David Rockefeller

INTRODUCTION

Lipopolysaccharide (LPS) or endotoxin is a major component of the outer membrane of gram-negative bacteria, which consists of Lipid A, a core polysaccharide, and O antigen, and is a strong inducer of innate immunity. Inhalation of endotoxin results in the recruitment of inflammatory cells and enhances the production of a variety of proinflammatory cytokines. A significant number of studies have shown that an endotoxin response is mediated through the interaction of the CD14/TLR4/MD2 receptor complex, which is linked intracellularly to NFκB pathways involved in the production of cytokines in many cell types, especially macrophages¹⁻⁴. Recent studies demonstrated that TLR-4 is also necessary for full development of ozone (O₃) induced lung injury^{5,6}. Inhalation of high concentrations (100 µg) of LPS before O₃ exposure has been shown to potentiate the effect of O₃ and induce lung inflammation^{7,8}.

O₃ is one of the major components of air pollution. It is a highly toxic constituent of photochemical smog and it reacts primarily with molecules at the air-fluid boundary because its low solubility in water limits its ability to diffuse into the tissues. The biological effects of O₃ are associated with oxidative stress in the lower respiratory tract and it may damage the epithelium, both directly and by triggering an inflammatory cascade that causes indirect damage⁹⁻¹¹. O₃-induced changes in the lung include an influx and activation of immune cells, increase in proinflammatory cytokines and chemokines, including the chemokines, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 and macrophage inflammatory protein (MIP)-2^{7,8,12-14}. O₃ exposure also causes surfactant dysfunction^{15,16}, although the mechanism for this remains unclear.

Pulmonary surfactant is a complex mixture of lipids and proteins. In addition to preventing alveolar collapse, its components play an important role in the first line of defense against various insults. Surfactant protein A (SP-A) is a major protein component of lung surfactant involved broadly in surfactant-related functions and in innate immunity¹⁷⁻²⁰. Concerning innate immunity, SP-A has been shown to enhance phagocytosis of a number of microorganisms²¹⁻²⁷, regulate complement activation²⁸, and augment the production of reactive oxygen and nitrogen species (RONS), a mechanism for killing pathogens^{22,29,30}. Deficits in these functions in SP-A deficient (SPA^{-/-}) (KO) mice make them susceptible to pneumonia^{27,30-32}. Evidence also indicates SP-A involvement in the regulation of inflammation, particularly with regard to lung injury

and repair, by regulation proinflammatory cytokines^{2,14,33}, clearance of apoptotic cells^{34,35}, and regulation of collagen and matrix metalloproteinases^{36,37}. Several studies have shown that various SP-A functions are adversely affected by oxidation³⁸⁻⁴¹ or nitration⁴²⁻⁴⁵. The authors recently reported that oxidation of SP-A increased immediately after O₃, before the oxidation of other proteins¹⁴, and also that during aging in the rat, SP-A undergoes disproportionately increased carbonylation compared to other bronchoalveolar lavage (BAL) proteins, suggesting increased susceptibility to oxidation⁴⁶. It was postulated that, on the one hand, decrements in SP-A function may occur due to oxidation and, on the other hand, SP-A, by way of this susceptibility to oxidation, may play a role in limiting tissue damage by scavenging excess RONS¹⁴.

Acute lung injury has been shown to alter the levels of pulmonary surfactant in BAL, although questions remain about the mechanisms responsible for this, because both increases and decreases in the levels of phospholipids have been reported after LPS insults^{16,47-49}. The lipids in surfactant, while primarily responsible for the reduction of surface tension can also influence the behaviour of immune cells. Surfactant lipids suppress the activation of immune cells and inhibit the production and release of proinflammatory cytokines^{50,51}. However, both SP-A and the surfactant lipids can be oxidized by O₃ or endogenous RONS^{39,40,44,52-55}, altering their function and potentially contributing to the inflammation resulting from O₃ exposure.

Exposure to O₃ is associated with changes in innate immunity and inflammatory processes in both KO and wild type (WT) mice, but differences between the two types were observed, indicating a role of SP-A in the first line of defense. Because exposure to multiple toxicants may result in injuries or responses that are not predicted by evaluation of exposure to individual toxicants, the present study was undertaken in order to investigate the effect of a low dose of LPS prior to O₃ exposure in WT mice with intact defenses and SP-A KO mice in which the innate host defense molecule, SP-A, has been ablated. The focus was on the early events occurring 4 hours after O₃ treatment, a time point that in previous studies¹⁴ showed significant changes in several relevant endpoints.

OBJECTIVES

The aim of the study was to determine whether mice treated with a low concentration of LPS are sensitized, altering their response to an oxidative stress such as that produced by the environmental pollutant O₃.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The study was conducted on pathogen-free male WT and SP-A KO male mice on the C57BL/6 genetic background. WT mice were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) and kept under standard environmental conditions in the animal facility at the Penn State College of Medicine. KO mice were maintained as specific pathogen-free mice under barrier/sterile conditions in the animal facility at the Penn State College of Medicine. Both WT and KO mice were fed rodent chow and tap water ad libitum. The body weight of the mice was in the range of 20-25 g. The Institutional Animal Care and Use Committee at the Penn State College of Medicine approved this study.

LPS dose response

Five to six week old WT male mice (n=4 mice/time point) received a single dose (0.2, 0.5, 1, 2, 50, or 200 ng) of smooth LPS (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma, St. Louis, MO) in 50 µl saline intrapharyngeally. Control mice received equal volumes of saline intrapharyngeally, in parallel. Treatments were administered by placing the 50 µl dose in the pharynx of anaesthetized mice. The mice aspirated the bolus and recovered from the instillation with no obvious ill effects. Based on the WT data, two low doses of LPS shown to have stimulatory effects on inflammation were selected for study in KO mice. Five to six week old KO mice (n=4 mice/time point) received a single dose of LPS (0.5 or 2 ng/mouse/50 µl in saline). Control mice received equal volumes of saline intrapharyngeally. Both WT and KO mice were sacrificed at 20 h after LPS treatment by anaesthetization with halothane and exsanguination. The 20 h time point was selected on the basis of a number of reports that showed LPS-induced injury to occur within 24 h of LPS treatment⁵⁶⁻⁵⁸. The lungs were subjected to BAL with normal saline.

LPS treatment followed by O₃ exposure in WT and KO mice

The 2 ng dose of LPS was selected for subsequent experimentation because it provided an effect on several outcomes from a low concentration of LPS. Five to six week old WT and KO mice (20-25 g) (n=4 mice/time point) received a single dose of LPS (2 ng) in 50 µl saline intrapharyngeally. Control mice received equal volumes of saline intrapharyngeally, in parallel. Thirteen hours after

LPS treatment, the animals were exposed to either filtered air (FA) or O₃ at a concentration of 2 ppm for 3 hours. These exposures were conducted in parallel at room temperature and 50% humidity as described elsewhere¹⁴. In brief, four mice were put in glass containers with wire mesh lids and then placed in a closed glass exposure chamber. The O₃ was generated by an electric discharge ozonizer (Model OZ2SS-SS, Ozotech, Yreka, CA) and its concentration was monitored with an ultraviolet ozone analyzer (Model 400A, Advanced Pollution Instrumentation, San Diego, CA). This system is highly efficient at delivering O₃ in specific concentrations between 0.1 ppm and 10 ppm⁵⁹. Four hours after the termination of exposure, the mice were sacrificed (total time of 20 hours after LPS treatment) by anesthetization and exsanguination. The lungs were subjected to BAL with normal saline.

Cell count and biochemical studies of BAL fluid

BAL fluid was obtained by instilling the lung 3 times with a volume of saline equal to 80% of lung vital capacity (for a total of 1.5 ml) through a tracheal cannula. The total fluid recovery was approximately 90% of the instilled volume and did not differ significantly between the experimental and control groups. The BAL fluid was centrifuged (150 x g, 5 min, 4°C) and the cell pellet was resuspended in 0.9% sodium chloride (NaCl). On each sample a total cell count was performed using a haemocytometer and a cytocentrifuge preparation was used to obtain differential cell counts. The cell-free supernatant was frozen and stored at a temperature of -80°C for subsequent biochemical analysis. Total protein concentration was determined using the Micro BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). For determination of total phospholipids, a 100 µl sample of BAL supernatant was lyophilized and assayed using the Phospholipids B Assay (WAKO Chemicals Inc, Richmond, VA).

Cytokine ELISAs

The concentration of MCP-1 and MIP-2 was measured on cell-free BAL samples with commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D systems, McKinley Place, NE). In brief, 500 µl of cell-free BAL were lyophilized and then reconstituted to 100 µl with the assay diluent provided in the kit. Assays were performed according to the manufacturer's recommendations, and the plates were read at 450 nm in a SPECTRA Fluor Plus ELISA plate reader (Tecan US, Research Triangle Park, NC) after the appropriate colour development period. The detection limits of these ELISA kits are 1.5 pg/ml for

MIP-2 and 2 pg/ml for MCP-1.

SP-A Dot Blot

SP-A levels in the BAL were determined by protein dot blot. Protein dot blotting was done by diluting 25 µl of the cell-free BAL fluid in 975 µl of 0.02 M Tris-buffered saline (pH 7.5; TBS) solution and applying 200 µl aliquots to Bio-Rad Trans Blot transfer medium (nitrocellulose, 0.45 µm) under vacuum in a 96 well dot blot apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA). Blots were blocked overnight in 0.01 M Na/K phosphate buffered saline (pH 7.2; PBS) containing 1% bovine serum albumin (BSA). Following blocking, blots were incubated in a solution containing polyclonal rabbit anti-SP-A IgG⁶⁰ (1:10,000) in PBS with 1% BSA, 0.05% Tween-20 for 1 h at RT and washed 3 times for 10 min with PBS, 0.5% Tween-20. The blots were then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody (goat anti-rabbit IgG HRP conjugate; 1:25,000) (Bio-Rad) and then washed as in the previous step. Antibody binding was detected by enhanced chemiluminescence (ECL). Blots were incubated for 1 min with 10 ml of each ECL solution (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA), and then wrapped in cellophane wrap, the excess solution removed, and exposed to Kodak X-Omat XAR film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). The film was developed and SP-A levels were quantified by laser densitometry.

Detection of oxidized protein in BAL

Oxidized proteins were detected using the OxyBlot Oxidized Protein Detection Kit (InterGen, Purchase, NY) as described previously¹⁴ with certain modifications. This kit detects carbonyl groups that have been introduced into proteins through oxidation. In brief, 25 µl of BAL samples were denatured by adding an equal volume of 12% SDS. Samples were then derivatized with 2.5 µl of 10X 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution and incubated for 10 min at room temperature. Derivatization was stopped with the addition of 25 µl of neutralization solution. Samples were then analyzed by dot blot. Aliquots containing the DNPH-derivatized proteins were brought up to a volume of 500 µl with 0.01 M phosphate buffered saline (pH 7.2) and 200 µl of each sample was blotted onto nitrocellulose by vacuum using a 96-well dot-blot apparatus (Bio-Rad). Immunodetection of oxidized proteins was performed according to the manufacturer's instructions, although the rabbit anti-DNP and goat anti-rabbit IgG (HRP-conjugated) antibodies supplied were used at one half of the recommended concentrations. ECL was used to detect antibody binding and the blots were exposed

to XAR film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). The film was developed and carbonylated protein levels were quantified by laser densitometry.

Oxidized and non-oxidized SP-A protein in BAL by Western Blot

BAL samples in 200 µl aliquots were concentrated by lyophilization. Protein samples were then subjected to electrophoresis on 12.5% SDS polyacrylamide gels. Two separate gels were run and then the separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane (nitrocellulose, 0.45 µm) for SP-A detection and on polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA) for oxidized SP-A in a buffer of 25 mM Tris base, 192 mM glycine, 20% methanol. Immunodetection of SP-A protein was made as described in the previous section of SP-A BAL protein dot blots. Oxidized SP-A protein was detected as described previously⁶¹, with some modifications. The membrane was dehydrated for 1 min with 100% methanol and then washed for 5 min in 0.02 M Tris (pH 7.5) with 20% methanol, 5 min with 2 N hydrochloric acid (HCl), and then treated with 100 µg DNPH/ml in 2 N HCl for 5 min. The membrane was again washed 3 times with 2 N HCl, 7 times with 100% methanol, and once with 0.02 M TBS (5 min each wash). The membrane was blocked overnight in 5% powdered milk (Carnation) in 0.02 M TBS, 0.05% Tween-20. All the post-transfer steps were made in 100 ml of solution at room temperature. Immunodetection of oxidized proteins was made, as described in the previous section on BAL protein dot blots.

Statistical analysis

All analyses for the linear trend model between dose and main outcome and non-parametric comparisons were performed using SAS V9.1 (SAS Institute, Cary, NC) and a p-value of less than 0.05 was considered significant. LPS dose was converted to log scale prior to analyses in order to satisfy the distributional assumption associated with the linear model. All the other data were analyzed by t-test (Sigma Stat; SPSS; Chicago, IL).

RESULTS

Behavioural Observations

Both WT and SP-A mice exposed to different doses of LPS appeared to behave similarly to those treated with saline. The mice that received a low dose of LPS followed by O₃ exposure behaved differently from those that re-

ceived LPS followed by FA exposure. Shortly after the start of the O₃ exposure period the fur of these mice became ruffled, and after 30 min to 1 hour, the O₃-exposed mice became less active, curled up, and appeared to sleep for the duration of the exposure period. Following the exposure, their activity returned to normal within the first hour. Mice exposed to LPS and FA remained active throughout the exposure period.

LPS dose response study for WT mice

The analysis of BAL revealed several changes in the

mice treated with LPS compared to the saline treated controls (Figure 1). These changes included a significant increase ($p < 0.05$) in the mean total BAL cell count (Fig. 1A), in the percentage of polymorphonuclear (PMN) leukocytes (Fig. 1B), and in the mean level of MIP-2 (Fig. 1C) starting for each end point at LPS dosage of ≥ 0.2 ng, ≥ 0.5 ng, and at ≥ 1 ng, respectively. Total protein (Fig. 1D) and its levels of oxidation (Fig. 1E), measured by carbonyl content for total oxidized protein, were also higher in LPS treated mice and reached significance ($p < 0.05$) at doses of LPS of 1 ng and higher. SP-A protein levels

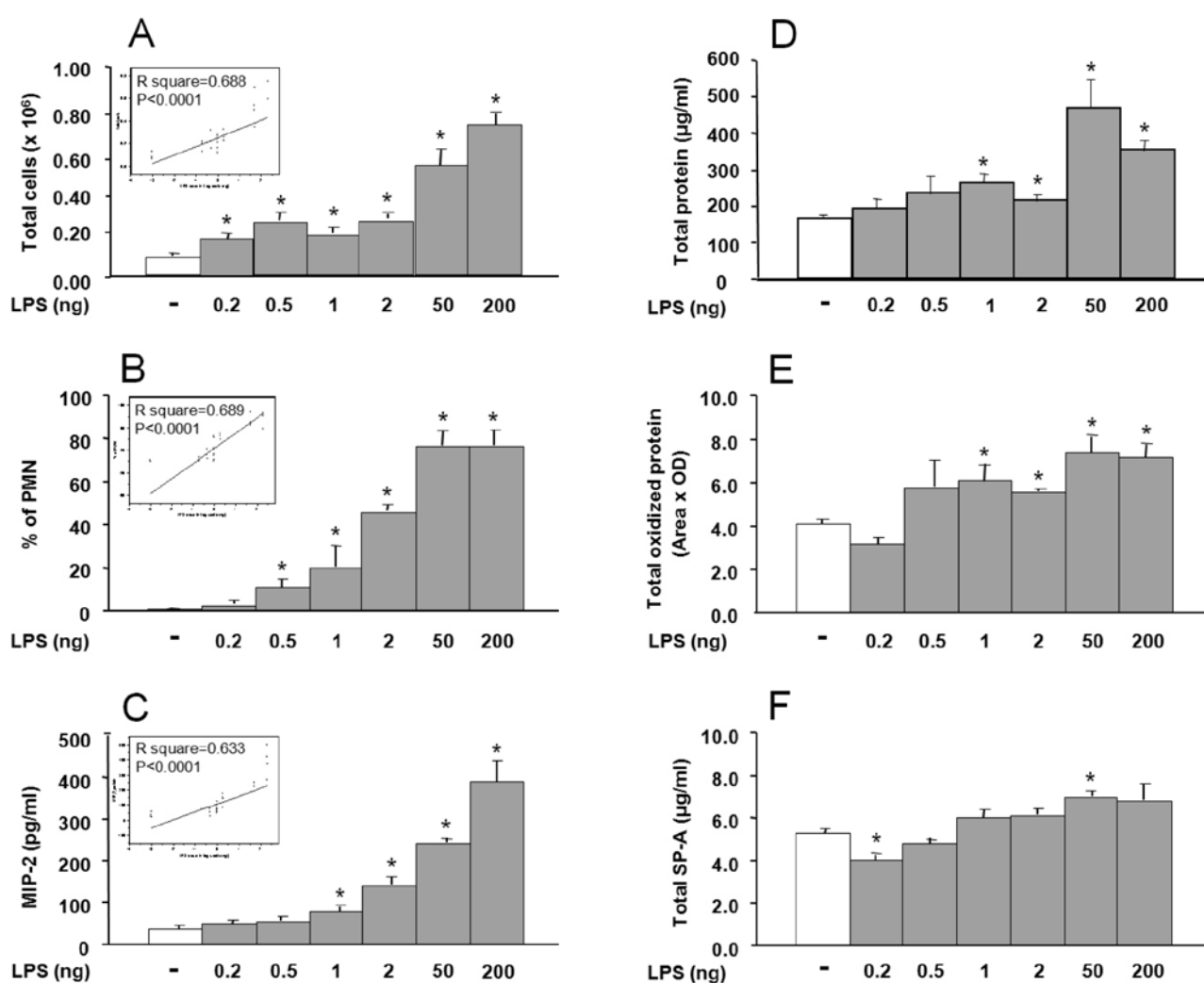


FIGURE 1. Lipopolysaccharide (LPS) effect on total cell and polymorphonuclear leukocyte (PMN) count, macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) content, total protein and total oxidized protein, and total surfactant protein A (SP-A) in bronchoalveolar lavage (BAL) of wild type (WT) mice. The mice received LPS at different concentrations (0.2, 0.5, 1, 2, 50, and 200 ng) intrapharyngeally in 50 µl saline. Control animals received 50 µl saline in parallel. BAL was collected 20 h after LPS treatment. Values are expressed as mean $\pm$ S.D., for total cells (A), PMNs (B), MIP-2 (C), total protein (D), total oxidized protein (E), and total SP-A protein (F). Statistically significant ($p \leq 0.05$) differences between LPS treated (gray bar) and control (open bar) mice ($n=4$ for each group) are indicated by an asterisk (*). The figure in the box represents the correlation between LPS dose and the indicated read-outs.

in BAL measured by protein dot blot for the most part remained at normal levels with a decrease and increase observed at 0.2 and 50 ng LPS, respectively, (Fig. 1F). No consistent change was observed in total phospholipids at any dose of LPS (not shown). The increases correlated with LPS dose (Figs. 1A, 1B, 1C) for total cells ($r^2=0.688$, $p<0.0001$), percentage of PMNs ($r^2=0.689$, $p<0.0001$), and the level of MIP-2 protein ($r^2=0.633$, $p<0.0001$). For the other parameters, no correlation was observed.

Comparison of LPS effect in WT and KO mice

KO mice LPS treated (0.5 ng or 2.0 ng/mouse) also showed signs of inflammation in the BAL (Figure 2). Significant differences were observed for both LPS doses in several endpoints (Figs. 2A-2D) compared to measurements in the BAL of control saline-treated mice. Control values for total oxidized protein (Fig. 2E) and total phospholipids (Fig. 2F) differed from one another so control values at were set at 100% and the LPS samples were calculated as a percentage of the control. Oxidized protein values increased after LPS and there was a trend toward greater increases in KO mice, although statistical significance was observed only at 0.5 ng LPS. With respect to phospholipids, LPS administration was associated with reduced levels and significant differences occurred at 0.5 ng LPS for WT, and at 2 ng LPS for KO mice.

On comparison of the KO data and WT data certain differences emerged: 1) Significant differences in the total number of cells (Fig. 2A) were observed between WT and KO at exposure to 0.5 ng of LPS but not 2 ng of LPS, indicating an inability of KO to respond to low levels of LPS, but this inability was overcome in the face of a more severe insult (i.e. 2 ng LPS); 2) PMN recruitment as assessed by the percent of PMNs (Fig. 2B) in BAL is gradual in WT; significant differences were observed between the two doses of LPS and between the LPS treated animals and the controls. For the KO no significant differences between the two doses of LPS were observed although PMN recruitment was increased in LPS treated animals compared to the controls. A decrease in macrophage/monocyte cell count in WT and KO (not shown) followed a pattern similar to that described for PMNs; 3) MIP-2 levels (Fig. 2C) for each group, for the most part, tended to parallel the observations made for PMNs, except for a lack of significant difference in WT between mice treated with 0.5 ng of LPS and controls. Taken together, these observations indicate that the response of KO mice to low levels of LPS is limited; 4) With regard to BAL protein (Fig. 2D), although no differences were observed between WT and KO mice

in total protein levels, there was a trend toward greater changes in total oxidized protein in KO mice than in WT mice; 5) A difference (decrease) in total phospholipids (Fig. 2F) was observed between control and LPS treated mice, but not between WT and KO mice.

Effect of O₃ or FA on BAL cells and cytokines in LPS treated WT and KO mice

Exposure of WT mice to LPS (2 ng) + O₃ resulted in significant increases ($p<0.05$) in several parameters in the BAL (Figure 3) compared to LPS + FA exposure. These differences included significant changes in the total cell count (Fig. 3A), levels of MIP-2 (Fig. 3C), and MCP-1 (not shown), total protein (Fig. 3D), and total oxidized protein (Fig. 3E) in BAL. No significant differences were observed between the groups of WT mice in the percentage of PMNs (Fig. 3B) or phospholipids (Fig. 3F).

Exposure of KO mice to LPS (2 ng) + O₃ resulted in significant ($p<0.05$) increases compared to the LPS + FA treated group, in the levels of MIP-2 (Fig. 3C) and MCP-1 (not shown), phospholipids (Fig. 3F), total protein (Fig. 3D) and oxidized protein (Fig. 3E). This LPS response pattern was similar to that observed in the WT mice, except that in the KO mice a significant increase in phospholipid levels in response to LPS + O₃ was observed compared to the LPS + FA mice, but no change in total BAL cell count.

Significant differences were observed between WT and KO mice after LPS + O₃ treatment in the percent of PMNs (Fig. 3B), MIP-2 (Fig. 3C), and phospholipid (Fig. 3F). No changes were observed between WT and KO mice with regards to the levels of MCP-1 (not shown), total protein (Fig. 3D), and total oxidized protein (Fig. 3E). Differences between WT and KO mice after LPS + FA were observed only for total cells (Fig. 3A).

The impact of LPS and O₃ on SP-A content and levels of oxidized SP-A

Small but significant increases in total SP-A content were observed in response to LPS + FA compared to FA alone (Fig. 4A). Similar increases were observed in response to LPS + O₃ compared to O₃ alone, indicating that LPS is the dominant factor for this increase. When the levels of oxidized SP-A were examined, significant differences were observed in the dimeric form of SP-A in response to O₃ and in response to LPS + O₃ (Fig. 4B). No significant differences were observed between LPS + FA and FA alone, indicating that changes in the oxidation state of SP-A are primarily due to O₃ exposure.

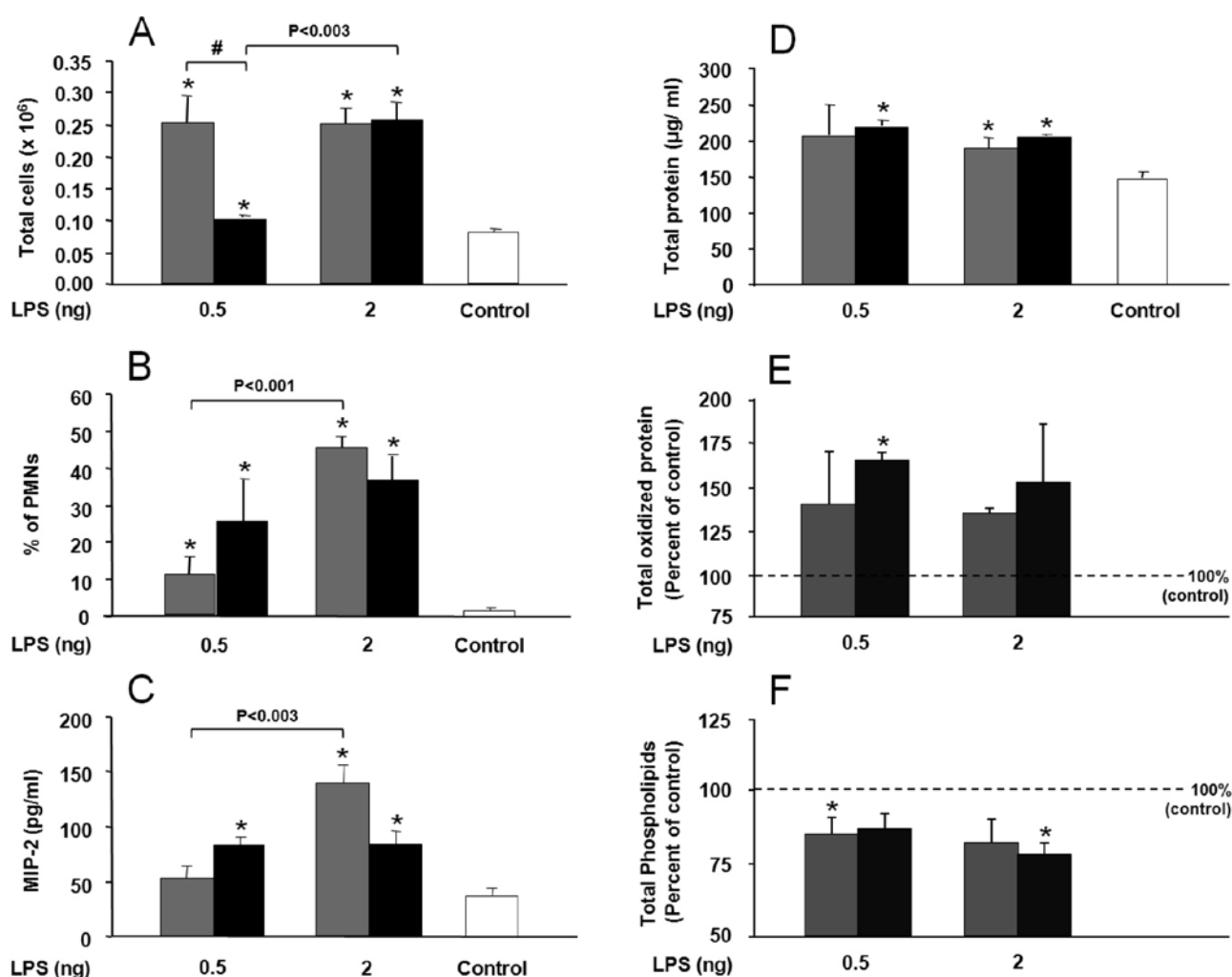


FIGURE 2. Lipopolysaccharide (LPS) effect on total cell and polymorphonuclear leukocyte (PMN) count, macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) content, total protein and oxidized protein, and total phospholipids in bronchoalveolar lavage (BAL) of surfactant protein A deficient (SP-A $-/-$) mice (KO) in comparison with wild type (WT) mice. The mice received intrapharyngeal instillation of selected LPS doses (0.5 ng and 2 ng) in 50 μ l saline. Control mice received 50 μ l saline in parallel. BAL was collected 20 h after LPS treatment. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=4) for WT (gray bars), KO (black bars). Filtered air (FA) control values are represented by a single bar (open bar) when no differences were seen between KO and WT mice (panels A, B, C, D). For panels E and F, where differences in basal levels between WT and KO were observed, the control values were set to 100% (dotted line). Data are shown for total cells (A), percentage of PMNs (B), MIP-2 (C), total protein (D), total oxidized protein (E), and total phospholipids (F). Statistically significant ($p \leq 0.05$) differences between LPS treated and control mice are indicated by an asterisk (*), and between WT and KO mice by the sign (#) above a connecting bar. Differences between LPS doses in WT or KO are shown by a connecting bar with the p-value above the bar.

DISCUSSION

The authors have previously reported¹⁴ that WT mice and KO mice of the same genetic background showed signs of inflammation in BAL fluids after exposure to O_3 (2 ppm) for three or six hours. Several aspects of the inflammatory response were less pronounced in KO mice, and

it was speculated that this occurs because in the absence of SP-A the alveolar macrophage is not primed by SP-A, rendering it less capable of mounting an effective inflammatory response. Other researchers reported that high dose LPS (100 μ g) inhalation, prior to O_3 exposure of WT mice, appeared to sensitize the mice to O_3 differentially at different postnatal ages, with regard to inflammatory

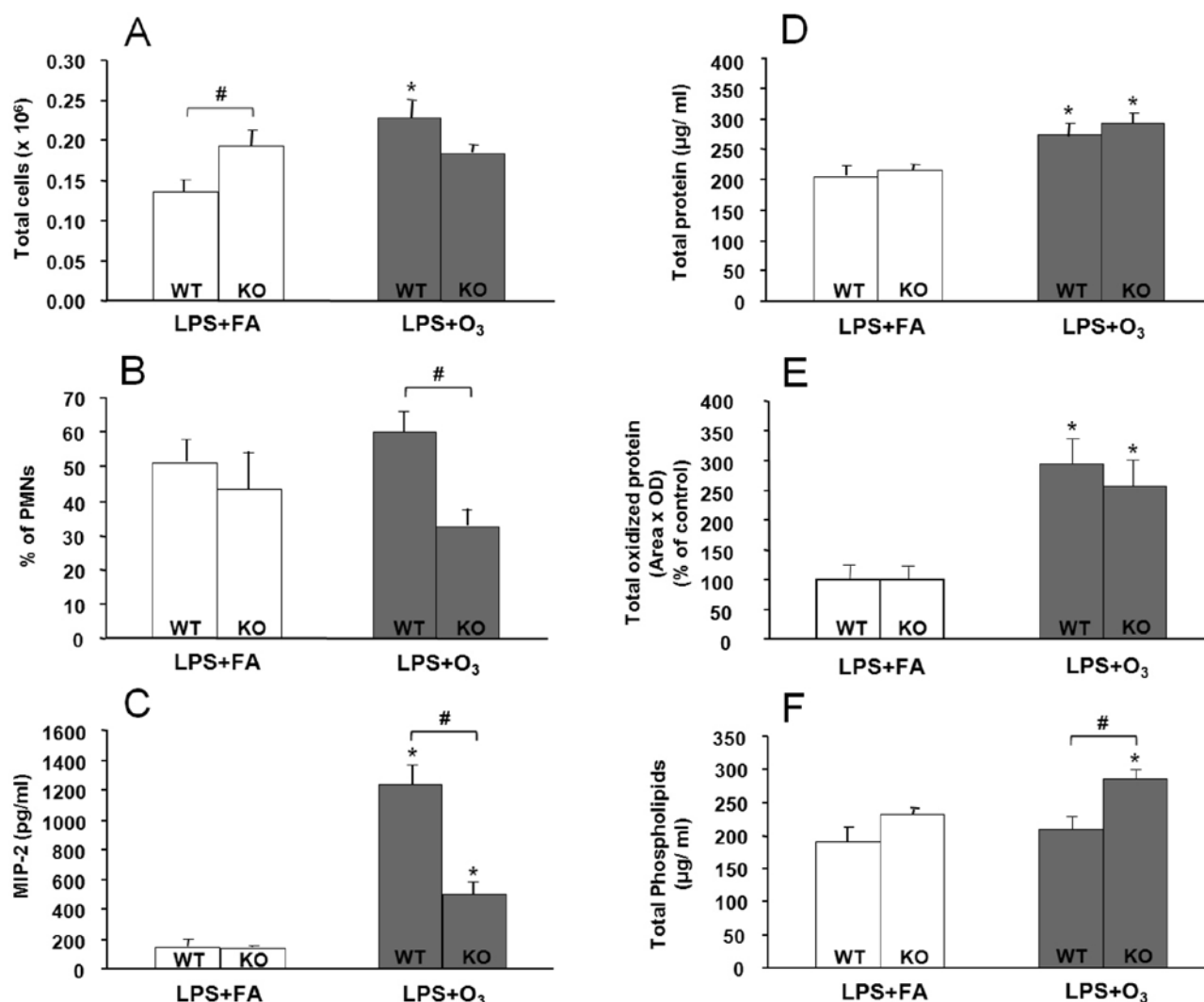


FIGURE 3. Effect of lipopolysaccharide (LPS) + filtered air (FA) or LPS + ozone (O₃) on total cell count, polymorphonuclear leukocyte (PMN) count, MIP-2, phospholipids, total protein, and total oxidized protein content in the bronchoalveolar lavage (BAL) of wild type (WT) and surfactant protein A deficient (SP-A^{-/-}) mice (KO). The mice received 2 ng of LPS intrapharyngeally in 50 μ l saline, and 13 h later they were exposed to either FA or O₃ (2 ppm for 3 h). BAL was collected 4 h following the conclusion of FA or O₃ exposures, or a total time of 20 h after LPS treatment. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=4) for LPS + FA (open bars), and LPS + O₃ (black bars). Data are shown for total cells (A), percentage of PMNs (B), MIP-2 (C), total protein (D), total oxidized protein (E), and phospholipids (F). Significant (p $\leq$ 0.05) differences between LPS + FA and, LPS + O₃ treated mice are indicated by an asterisk (*), and between WT and KO with the pound sign (#) above a connecting bar (p $\leq$ 0.05).

markers⁸. The present study was designed to investigate the hypothesis that low doses of instilled LPS adversely affect the inflammatory processes in the lung and potentiate differentially the impact of O₃-induced injury in mice with intact innate immunity (i.e., WT mice) and those with compromised innate immunity (i.e., KO mice).

The results showed that: 1) a low dose of LPS (2 ng) alters the cellular, cytokine, total protein and oxidized protein content of the BAL of WT mice at 20 h after LPS

treatment; 2) differences are observed between WT and KO mice after LPS exposure (0.5 or 2 ng) in the total cell count, the MIP-2 response pattern, and the base levels of oxidized protein and phospholipid content; 3) when 3 h ozone exposure follows 13 h after LPS (2 ng) treatment, differences between WT and KO mice are observed in PMNs, MIP-2 protein and phospholipid content of BAL; 4) in WT an increase in total SP-A is observed in response to LPS + FA or LPS + O₃ but not in response to O₃ alone. An

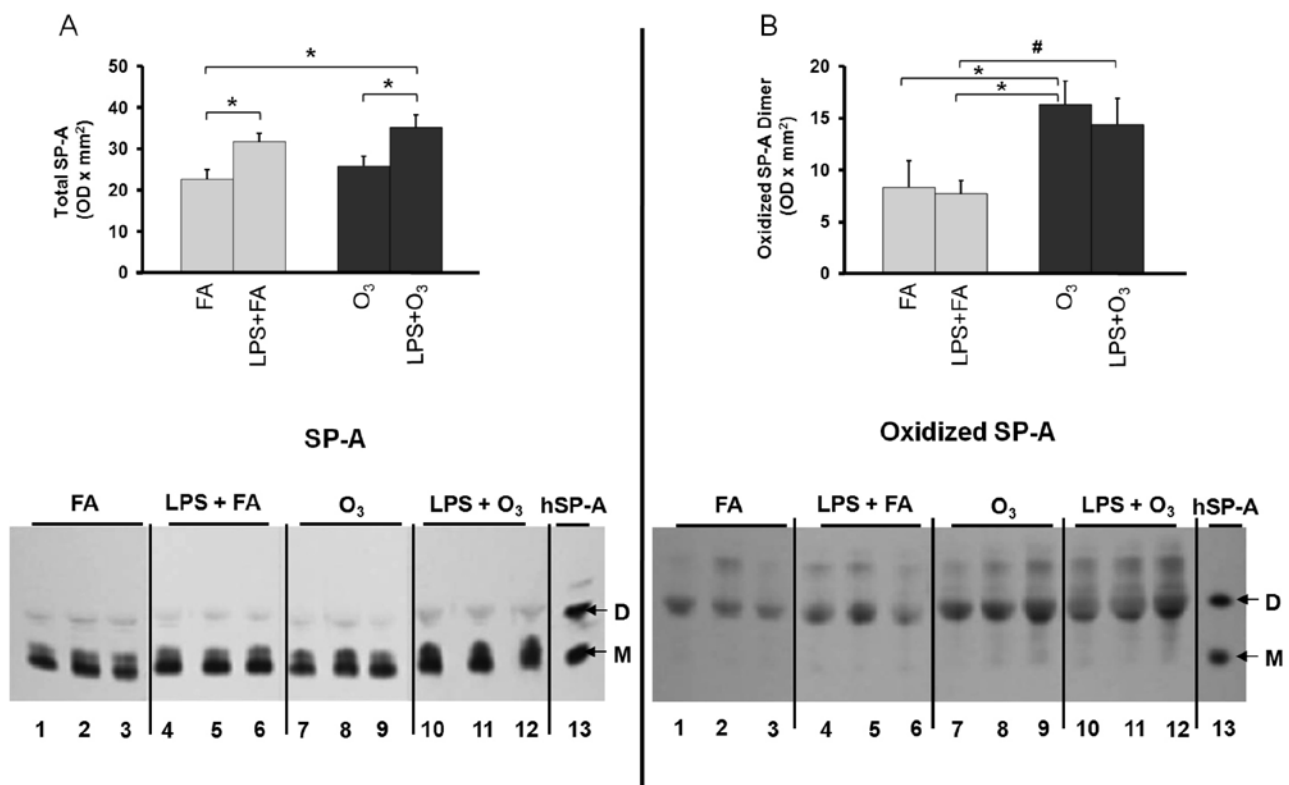


FIGURE 4. The effects of lipopolysaccharide (LPS) with or without ozone (O₃), O₃ alone or filtered air (FA) alone on the level of surfactant protein A (SP-A) (Panel A) and oxidized SP-A (Panel B) in the bronchoalveolar lavage (BAL) of wild type (WT) mice. The mice received 2 ng of LPS intrapharyngeally in 50 μ l saline, then 13 h later they were exposed to either FA (gray bars) or O₃ (2 ppm for 3 h) (black bars) and subjected to BAL 4 h after ozone exposure or 20 h after LPS treatment. SDS gel electrophoresis was performed on concentrated samples from 200 μ l of BAL fluid and the proteins transferred to membranes as described in Methods. Levels of SP-A (Panel A; top) and oxidized SP-A (Panel B; top) were measured by densitometry of Western blots. For each condition n=6 except for FA, where n=5. At the bottom of panels A and B a representative immunoblot (Panel A) and an oxyblot (Panel B) are shown. A reference lane is shown that contains immunostained human alveolar proteinosis SP-A (hSP-A) with bands of monomeric (M) and dimeric (D) SP-A marked in each panel. The position of the oxidized SP-A dimer bands was determined by comparison with an identical immunoblot stained with an antiserum to SP-A. The values depicted are the mean $\pm$ S.D. Significant ($p \leq 0.05$) differences between LPS + FA and LPS + O₃ treated mice are indicated by the pound sign (#) and other comparisons by an asterisk (*).

increase in oxidized SP-A dimer is observed in response to O₃ or LPS + O₃ but not in response to LPS + FA; 5) LPS treatment has no apparent impact on behaviour, whereas during the course of O₃ exposure, both WT and KO mice become less active. These findings together allow the conclusion that: 1) low level LPS insult can have long lasting effects on BAL composition; 2) a second stimulus may result in more pronounced effects than those produced by each stimulus alone; and 3) SP-A plays a role in the regulation of inflammation.

The differences between the WT and KO mice in response to LPS are long-lasting, as they were detectable 20 h after LPS treatment, and are limited to the total BAL cell count and the pattern of the MIP-2 response. Although the

reasons for this are not fully understood, these findings support the theory that in WT mice the alveolar cells, and most likely the macrophages, in the face of a weak threat (i.e. 0.5 ng LPS) can, via small non-significant changes in MIP-2 expression, mediate a significant recruitment of cells into the alveolar space. When the insult is stronger (i.e., 2 ng LPS), increases in molecules such as MIP-2, a macrophage-produced neutrophil chemoattractant molecule, are necessary for adequate cell recruitment. When the activity of the alveolar cells is compromised with regard to the first line of defense, as could be the case with the KO mice, the low level threat (0.5 ng LPS) appears to be perceived as a higher level threat (i.e. 2 ng LPS) and this results in an increase in molecules such as

MIP-2. The increased MIP-2 production in the KO mice in response to a low level insult, failed to translate to the increase of total cells in the alveolar space seen in the WT mice that could presumably help to eliminate the perceived threat. Together these observations are consistent with the idea that KO mice exhibit a compromised and/or limited response compared to WT mice. It is possible that the alveolar macrophages of the KO mice, in contrast to those of the WT mice, are not adequately prepared to effectively mount a response to LPS. It has been postulated that the alveolar macrophages in the absence of SP-A are hypoactive due to lack of priming by SP-A¹⁸. Inability of KO mice alveolar macrophages to function at a level similar to that of the WT mice has been observed recently with regards to phagocytosis of *K. pneumoniae*²⁷ and in several other studies where SP-A KO mice have been used. These include the inability of SP-A in KO mice to clear *P. aeruginosa* infection^{32,62} and group B streptococcus⁶³, and the ability of SP-A to modulate inflammatory processes, and minimize lung injury and mortality after experimental bone marrow transplantation⁶⁴⁻⁶⁶.

When a second insult (i.e. O₃ exposure) was imposed upon the LPS-treated mice, a significant decrease in PMNs and MIP-2 protein content was observed in the BAL of KO mice compared to WT mice, although both types of mice showed a significant increase in MIP-2 compared to LPS + FA treated mice. In contrast, when a single insult was present (either LPS (2 ng) or O₃ exposure¹⁴) no differences in MIP-2 protein or PMNs (in LPS only) were observed between WT and KO mice, even though both types showed increase in MIP-2 protein and PMNs compared to non-treated controls. In the earlier O₃ study¹⁴, although no difference between WT and KO mice was observed in response to O₃ in BAL MIP-2 protein, the MIP-2 mRNA content was significantly lower in the KO than in the WT mice. These observations indicate that prior LPS treatment may up-regulate MIP-2 expression via a translational control. On the other hand O₃ exposure in the KO mouse may negatively affect posttranscriptional processes involved in MIP-2 expression. These possibilities could explain the lower levels of MIP-2 protein observed in response to LPS + O₃ in the KO mice compared to the WT mice, and implicate SP-A in the regulation of MIP-2.

The data from the earlier O₃-exposure study¹⁴ indicate also that translation of MIP-2 may be halted entirely in the KO mouse, as assessed by the lack of difference in mRNA content between O₃-exposed and control KO mice. Moreover, although LPS and O₃ may each have an

individual impact on MIP-2 production, the mechanisms via which this occurs are likely to differ or overlap. In the WT mice the change in MIP-2 levels with the combined exposure (LPS + O₃) was greater than the sum of changes resulting from individual exposures (LPS or O₃ alone). The MIP-2 values for the controls were 36 pg/ml ± 16, for LPS treated 148 pg/ml ± 38, and for those following O₃ exposure (without prior LPS treatment) 627 pg/ml ± 205¹⁴. However, after exposure to both LPS and O₃, MIP-2 levels reached 1,234 pg/ml ± 277, raising the possibility of synergism between the two agents. This synergism appears to be significantly compromised in the KO mouse, indicating a role for SP-A in the regulation of inflammation, and specifically the production of MIP-2.

Increased SP-A content in WT mice was observed in response to LPS and in agreement with the earlier O₃ study¹⁴ no differences in SP-A content were observed in response to O₃ exposure, indicating that the SP-A increase observed in response to LPS + O₃ is primarily mediated by LPS. On the other hand, an increased level of oxidized SP-A was observed in response to O₃, in both the present study and the earlier report¹⁴, but not in response to LPS, indicating that the oxidative stress mediated by O₃ exposure is responsible for the increased content of oxidized SP-A in response to LPS + O₃. The differences in SP-A content and oxidized SP-A observed in response to LPS and O₃, both separately and in combination, indicate further that each agent operates via a different mechanism, and that LPS affects SP-A quantitatively, perhaps by interfering with its regulation, whereas O₃ affects SP-A qualitatively by increasing oxidation of its dimeric form. At first glance it appears that LPS and O₃ work at cross-purposes in terms of SP-A, as LPS increases the production and O₃ increases the oxidation of SP-A. Recent studies have shown that oxidized SP-A exhibits reduced function^{27,39-41} and therefore even if the SP-A content is increased, the functional SP-A content may not change under the experimental conditions of this study. SP-A, however, has been shown to be oxidized earlier than the total BAL protein content^{14,46}, indicating that SP-A may play a protective role in response to an oxidative stress by scavenging RONS and serving as a sacrificial antioxidant^{67,68}. According to this scenario, SP-A may serve as the sacrificial molecule, as its high susceptibility to oxidation may scavenge reactive oxidants and protect other molecules from becoming inactivated by oxidation. Alternatively, as postulated previously¹⁴ the oxidation of dimeric SP-A may be important in signalling, and thus some of the defects observed in the KO mice

may be due to lack of SP-A-mediated signalling in time of stress. Moreover, deficits of immune cell function, in both macrophages and neutrophils, and in the regulation of RONS production have been observed in KO mice, thereby implicating SP-A in these processes^{14,29-31}.

In summary, the findings of this study lead to several conclusions: 1) A low dose of LPS can have a long-lasting effect on several aspects of BAL properties including cell count, cytokines, protein content, and other indices. 2) SP-A plays a role in the processes of inflammation in response to LPS and/or O₃ exposure. LPS appears to have an impact on SP-A regulation, affecting the quantitative content of SP-A and the O₃ effect on SP-A dimer oxidation, thus altering SP-A qualitatively, which may have an impact on its function. 3) SP-A appears to play a role in the regulation of MIP-2 perhaps via its ability to "prime" alveolar macrophages for an appropriate response in the face of an insult. LPS and O₃ exposure probably modulate MIP-2 expression via different mechanisms. 4) Exposure to a low dose of LPS and O₃ revealed some unexpected outcomes that were not observed with either insult alone, indicating that these agents operate via different and/or overlapping mechanisms. Finally, the present findings support the theory that in the absence of SP-A, alveolar macrophages may not be able to elicit an appropriate response to insulting agents, implicating SP-A in a role of adequately preparing or priming macrophages to respond.

Acknowledgements: *The authors thank Julie Graham for typing. This work was supported by ES0098882 from the National Institute of Environmental Health Sciences.*

REFERENCES

1. Sweet MJ, Hume DA. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol.* 1996 Jul;60(1):8-26.
2. Song M, Phelps DS. Interaction of surfactant protein A with lipopolysaccharide and regulation of inflammatory cytokines in the THP-1 monocytic cell line. *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):6611-7.
3. Broad A, Jones DE, Kirby JA. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem.* 2006;13(21):2487-502.
4. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Jan;3(1):36-46.
5. Kleeberger SR, Reddy SP, Zhang LY, Cho HY, Jedlicka AE. Toll-like receptor 4 mediates ozone-induced murine lung hyperpermeability via inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Feb;280(2):L326-33.
6. Kleeberger SR, Reddy S, Zhang LY, Jedlicka AE. Genetic susceptibility to ozone-induced lung hyperpermeability: role of toll-like receptor 4. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 May;22(5):620-7.
7. Johnston CJ, Oberdorster G, Gelein R, Finkelstein JN. Endotoxin potentiates ozone-induced pulmonary chemokine and inflammatory responses. *Exp Lung Res.* 2002 Sep;28(6):419-33.
8. Johnston CJ, Holm BA, Finkelstein JN. Sequential exposures to ozone and lipopolysaccharide in postnatal lung enhance or inhibit cytokine responses. *Exp Lung Res.* 2005 May;31(4):431-47.
9. Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(3):245-65.
10. Kennedy CH, Hatch GE, Slade R, Mason RP. Application of the EPR spin-trapping technique to the detection of radicals produced in vivo during inhalation exposure of rats to ozone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992 May;114(1):41-6.
11. Hollingsworth JW, Kleeberger SR, Foster WM. Ozone and pulmonary innate immunity. *Proc Am Thorac Soc.* 2007 Jul;4(3):240-6.
12. Zhao Q, Simpson LG, Driscoll KE, Leikauf GD. Chemokine regulation of ozone-induced neutrophil and monocyte inflammation. *Am J Physiol.* 1998 Jan;274(1 Pt 1):L39-46.
13. Driscoll KE, Simpson L, Carter J, Hassenbein D, Leikauf GD. Ozone inhalation stimulates expression of a neutrophil chemotactic protein, macrophage inflammatory protein 2. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993 Apr;119(2):306-9.
14. Haque R, Umstead TM, Ponnuru P, Guo X, Hawgood S, Phelps DS, et al. Role of surfactant protein-A (SP-A) in lung injury in response to acute ozone exposure of SP-A deficient mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 Apr 1;220(1):72-82.
15. Currie WD, van Schaik SM, Vargas I, Enhorning G. Ozone affects breathing and pulmonary surfactant function in mice. *Toxicology.* 1998 Jan 16;125(1):21-30.
16. Muller B, Seifart C, Barth PJ. Effect of air pollutants on the pulmonary surfactant system. *Eur J Clin Invest.* 1998 Sep;28(9):762-77.
17. Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:521-54.
18. Floros J, Phelps DS. Pulmonary surfactant protein A; structure, expression, and its role in innate host defense. In: Nakos G, ed. *Surfactant-Update of Intensive Care Medicine.* Ioannina, Greece 2002:87-102.
19. Phelps DS. Surfactant regulation of host defense function in the lung: a question of balance. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2001 Jul-Aug;20(4):269-92.
20. Wright JR. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. *J Clin Invest.* 2003 May;111(10):1453-5.
21. van Iwaarden JF, van Strijp JA, Ebskamp MJ, Welmers AC, Verhoef J, van Golde LM. Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of herpes simplex virus type 1 by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1991 Aug;261(2 Pt 1):L204-9.
22. Madan T, Eggleton P, Kishore U, Strong P, Aggrawal SS, Sarma PU, et al. Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun.* 1997 Aug;65(8):3171-9.

23. Allen MJ, Harbeck R, Smith B, Voelker DR, Mason RJ. Binding of rat and human surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4563-9.
24. Ding J, Umstead TM, Floros J, Phelps DS. Factors affecting SP-A-mediated phagocytosis in human monocytic cell lines. *Respir Med*. 2004 Jul;98(7):637-50.
25. Mikerov AN, Umstead TM, Huang W, Liu W, Phelps DS, Floros J. SP-A1 and SP-A2 variants differentially enhance association of *Pseudomonas aeruginosa* with rat alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Jan;288(1):L150-8.
26. Mikerov AN, Wang G, Umstead TM, Zacharatos M, Thomas NJ, Phelps DS, et al. Surfactant protein A2 (SP-A2) variants expressed in CHO cells stimulate phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* more than do SP-A1 variants. *Infect Immun*. 2007 Mar;75(3):1403-12.
27. Mikerov AN, Haque R, Gan X, Guo X, Phelps DS, Floros J. Ablation of SP-A has a negative impact on the susceptibility of mice to *Klebsiella pneumoniae* infection after ozone exposure: sex differences. *Respir Res*. 2008 Dec 4;9(1):77.
28. Watford WT, Wright JR, Hester CG, Jiang H, Frank MM. Surfactant protein A regulates complement activation. *J Immunol*. 2001 Dec 1;167(11):6593-600.
29. Hickman-Davis JM, Gibbs-Erwin J, Lindsey JR, Matalon S. Role of surfactant protein-A in nitric oxide production and mycoplasma killing in congenic C57BL/6 mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Mar;30(3):319-25.
30. LeVine AM, Hartshorn K, Elliott J, Whitsett J, Korfhagen T. Absence of SP-A modulates innate and adaptive defense responses to pulmonary influenza infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Mar;282(3):L563-72.
31. Atochina EN, Beck JM, Preston AM, Haczku A, Tomer Y, Scanlon ST, et al. Enhanced lung injury and delayed clearance of *Pneumocystis carinii* in surfactant protein A-deficient mice: attenuation of cytokine responses and reactive oxygen-nitrogen species. *Infect Immun*. 2004 Oct;72(10):6002-11.
32. LeVine AM, Kurak KE, Bruno MD, Stark JM, Whitsett JA, Korfhagen TR. Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Oct;19(4):700-8.
33. Alcorn JF, Wright JR. Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD14-independent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Jan;286(1):L129-36.
34. Reidy MF, Wright JR. Surfactant protein A enhances apoptotic cell uptake and TGF-beta1 release by inflammatory alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Oct;285(4):L854-61.
35. Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, Botto M, et al. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169(7):3978-86.
36. Vazquez de Lara L, Becerril C, Montano M, Ramos C, Maldonado V, Melendez J, et al. Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Nov;279(5):L950-7.
37. Vazquez de Lara LG, Umstead TM, Davis SE, Phelps DS. Surfactant protein A increases matrix metalloproteinase-9 production by THP-1 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Oct;285(4):L899-906.
38. Huang W, Wang G, Phelps DS, Al-Mondhry H, Floros J. Human SP-A genetic variants and bleomycin-induced cytokine production by THP-1 cells: effect of ozone-induced SP-A oxidation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Mar;286(3):L546-53.
39. Wang G, Umstead TM, Phelps DS, Al-Mondhry H, Floros J. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein A variants to stimulate cytokine production. *Environ Health Perspect*. 2002 Jan;110(1):79-84.
40. Wang G, Bates-Kenney SR, Tao JQ, Phelps DS, Floros J. Differences in biochemical properties and in biological function between human SP-A1 and SP-A2 variants, and the impact of ozone-induced oxidation. *Biochemistry*. 2004 Apr 13;43(14):4227-39.
41. Mikerov AN, Umstead TM, Gan X, Huang W, Guo X, Wang G, et al. Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Jan;294(1):L121-30.
42. Davis IC, Zhu S, Sampson JB, Crow JP, Matalon S. Inhibition of human surfactant protein A function by oxidation intermediates of nitrite. *Free Radic Biol Med*. 2002 Dec 15;33(12):1703-13.
43. Haddad IY, Zhu S, Ischiropoulos H, Matalon S. Nitration of surfactant protein A results in decreased ability to aggregate lipids. *Am J Physiol*. 1996 Feb;270(2 Pt 1):L281-8.
44. Zhu S, Haddad IY, Matalon S. Nitration of surfactant protein A (SP-A) tyrosine residues results in decreased mannose binding ability. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Sep 1;333(1):282-90.
45. Zhu S, Kachel DL, Martin WJ, 2nd, Matalon S. Nitrated SP-A does not enhance adherence of *Pneumocystis carinii* to alveolar macrophages. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):L1031-9.
46. Umstead TM, Freeman WM, Chinchilli VM, Phelps DS. Age-related changes in the expression and oxidation of bronchoalveolar lavage proteins in the rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Jan;296(1):L14-29.
47. Fehrenbach H, Brasch F, Uhlig S, Weisser M, Stamme C, Wendel A, et al. Early alterations in intracellular and alveolar surfactant of the rat lung in response to endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 May;157(5 Pt 1):1630-9.
48. Viviano CJ, Bakewell WE, Dixon D, Dethloff LA, Hook GE. Altered regulation of surfactant phospholipid and protein A during acute pulmonary inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Dec 7;1259(3):235-44.
49. Quintero OA, Korfhagen TR, Wright JR. Surfactant protein A regulates surfactant phospholipid clearance after LPS-induced injury in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Jul;283(1):L76-85.
50. Kremlev SG, Phelps DS. Effect of SP-A and surfactant lipids on expression of cell surface markers in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol*. 1997 Jun;272(6 Pt 1):L1070-7.
51. Walti H, Polla BS, Bachelet M. Modified natural porcine surfactant inhibits superoxide anions and proinflammatory mediators released by resting and stimulated human monocytes. *Pediatr*

- Res. 1997 Jan;41(1):114-9.
52. Haagsman HP, van Golde LM. Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:441-64.
 53. Oosting RS, van Greevenbroek MM, Verhoef J, van Golde LM, Haagsman HP. Structural and functional changes of surfactant protein A induced by ozone. *Am J Physiol.* 1991 Aug;261(2 Pt 1):L77-83.
 54. Putman E, van Golde LM, Haagsman HP. Toxic oxidant species and their impact on the pulmonary surfactant system. *Lung.* 1997;175(2):75-103.
 55. Uhlson C, Harrison K, Allen CB, Ahmad S, White CW, Murphy RC. Oxidized phospholipids derived from ozone-treated lung surfactant extract reduce macrophage and epithelial cell viability. *Chem Res Toxicol.* 2002 Jul;15(7):896-906.
 56. Szarka RJ, Wang N, Gordon L, Nation PN, Smith RH. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. *J Immunol Methods.* 1997 Mar 10;202(1):49-57.
 57. Wagner JG, Van Dyken SJ, Wierenga JR, Hotchkiss JA, Harkema JR. Ozone exposure enhances endotoxin-induced mucous cell metaplasia in rat pulmonary airways. *Toxicol Sci.* 2003 Aug;74(2):437-46.
 58. Delayre-Orthez C, Becker J, de Blay F, Frossard N, Pons F. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005 Dec;138(4):298-304.
 59. Umstead TM, Phelps DS, Wang GR, Floros J, Tarkington BK. In vitro exposure of proteins to ozone. *Toxicology Mechanisms and Methods.* 2002 01;12(1):1-16.
 60. Wang G, Phelps DS, Umstead TM, Floros J. Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF-alpha production in the THP-1 cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 May;278(5):L946-54.
 61. Robinson CE, Keshavarzian A, Pasco DS, Frommel TO, Winship DH, Holmes EW. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem.* 1999 Jan 1;266(1):48-57.
 62. Giannoni E, Sawa T, Allen L, Wiener-Kronish J, Hawgood S. Surfactant proteins A and D enhance pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Jun;34(6):704-10.
 63. LeVine AM, Kurak KE, Wright JR, Watford WT, Bruno MD, Ross GF, et al. Surfactant protein-A binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Feb;20(2):279-86.
 64. Yang S, Milla C, Panoskaltis-Mortari A, Hawgood S, Blazar BR, Haddad IY. Surfactant protein A decreases lung injury and mortality after murine marrow transplantation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Sep;27(3):297-305.
 65. Haddad IY, Milla C, Yang S, Panoskaltis-Mortari A, Hawgood S, Lacey DL, et al. Surfactant protein A is a required mediator of keratinocyte growth factor after experimental marrow transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Sep;285(3):L602-10.
 66. Hickman-Davis JM, Wang Z, Fierro-Perez GA, Chess PR, Page GP, Matalon S, et al. Surfactant dysfunction in SP-A^{-/-} and iNOS^{-/-} mice with mycoplasma infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Jan;36(1):103-13.
 67. Kim IG, Park SY, Oh TJ. Dithiothreitol induces the sacrificial antioxidant property of human serum albumin in a metal-catalyzed oxidation and gamma-irradiation system. *Arch Biochem Biophys.* 2001 Apr 1;388(1):1-6.
 68. Sayed AA, Cook SK, Williams DL. Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. *J Biol Chem.* 2006 Jun 23;281(25):17001-10.

Κλινικά, ακτινολογικά και μοριακά ευρήματα σε τρεις ασθενείς με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, μετά από μακροχρόνια χορήγηση ιντερφερόνης γ-1b

Αθανασία Πρόκλου¹,
Φωτεινή Οικονομίδου¹,
Κατερίνα Αντωνίου¹,
Ελένη Τζωρτζάκη¹,
Αργυρώ Βολουδάκη²,
Κατερίνα Μαλαγάρη³,
Νικόλαος Σιαφάκας¹

¹Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημιακού
Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

²Ακτινολογικό Τμήμα Πανεπιστημιακού
Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

³Ακτινολογικό Τμήμα Πανεπιστημίου Αθηνών

Λέξεις κλειδιά:

- πολυμορφοπύρρηνο κύτταρο
- κυτταροκίνες
- οξειδωση
- μακροφάγο
- όζον

Αλληλογραφία:

Νικόλαος Σιάφκας
Καθηγητής Πνευμονολογίας
Πνευμονολογική Κλινική
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης
71110 Ηράκλειο - Κρήτη
Τηλ: 2810 392433, Fax: (30) 2810542650
E-mail: siafak@med.uoc.gr

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η γ-ιντερφερόνη (IFN-γ-1b) είναι ένας αντι-ινωτικός παράγοντας, ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια στη θεραπεία της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (Ι.Π.Ι), αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν έχει εξακριβωθεί. Σας παρουσιάζουμε την εμπειρία μας από τη μελέτη τριών ασθενών με Ι.Π.Ι. οι οποίοι έλαβαν για πέντε έτη IFN-γ-1b. **ΜΕΘΟΔΟΣ:** Μελετήσαμε 3 ασθενείς με ιστολογικά τεκμηριωμένη Ι.Π.Ι. ήπιας και μέτριας βαρύτητας, οι οποίοι λάμβαναν 200μg IFN-γ-1b τρεις φορές την εβδομάδα, χορηγούμενη υποδορίως και συγχρόνως 10mg πρεδνιζολόνης ημερησίως. Οι ασθενείς εκτιμούνταν ετησίως για τουλάχιστον τέσσερα χρόνια συμφωνά με τις οδηγίες της ATS/ERS, όσον αφορά την συμπτωματολογία, τις λειτουργικές δοκιμασίες των πνευμόνων (PFTs), καθώς και την ακτινολογική εικόνα με υψηλής ευκρίνειας αξονική τομογραφία θώρακα (HRCT). Τέλος, μετρήθηκε η έκφραση του γονιδίου transforming growth factor-β1 (TGF-β1), του γονιδίου connective tissue growth factor (CTGF) και του γονιδίου της IFN-γ σε πνευμονικό ιστό, πριν και δυο έτη μετά την έναρξη της αγωγής, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της RT-PCR. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Όλοι οι ασθενείς που έλαβαν την παραπάνω αγωγή δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες παρενέργειες και δεν εμφάνισαν οξεία επιδείνωση της νόσου. Επίσης, παρέμειναν σταθεροί όσον αφορά στα συμπτώματα και τις λειτουργικές δοκιμασίες των πνευμόνων. Οι δύο εκ των τριών ασθενών παρουσίασαν βελτίωση στην αξονική τομογραφία υψηλής ευκρίνειας θώρακα. Παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση των mRNA, TGF-β1 και CTGF γονιδίων στον πνευμονικό ιστό πριν την έναρξη της θεραπείας, ενώ παρατηρήθηκε μηδενική έκφραση της IFN-γ στο πνευμονικό ιστό των ασθενών πριν από την έναρξη της αγωγής. Αντίθετα, μετά από δυο χρόνια θεραπείας και οι τρεις ασθενείς παρουσίασαν επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της IFN-γ ($p<0.05$), ενώ τα επίπεδα του TGF-β1 και του CTGF

δεν μεταβλήθηκαν. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Η μακροχρόνια θεραπεία με IFN gamma-1b σε τρεις ασθενείς με ήπια ή και μετρίου βαρύτητας ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση είναι ασφαλής. Μετά από μακροχρόνια χορήγηση του φαρμάκου οι δύο από τους ασθενείς παρέμειναν σταθεροί, πιθανότατα μέσω της επαγωγής του ενδογενούς γονιδίου της ιντερφερόνης-γ. *Πνεύμων 2009, 22(2):156-161.*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Ιδιοπαθής Πνευμονική Ίνωση είναι μια νόσος του διάμεσου πνευμονικού ιστού η οποία χαρακτηρίζεται από ίνωση και ήπια φλεγμονώδη αντίδραση¹. Πρόκειται για μια προοδευτικά εξελισσόμενη προς το θάνατο νόσο, στην οποία δεν παρατηρείται παράταση της επιβίωσης των ασθενών με τη συμβατική θεραπεία, όπως κορτικοειδή και κυτταροστατικά φάρμακα². Η νόσος εξελίσσεται συνήθως γρήγορα χωρίς αγωγή. Η πρόγνωση της Ι.Π.Ι. είναι πτωχή και η θνησιμότητα είναι ιδιαίτερα αυξημένη³.

Η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ-1b) είναι ισχυρός αντιινωτικός παράγοντας, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, την σύνθεση του κολλαγόνου, ενώ επιπλέον προάγει την απόπτωση των ινοβλαστών και την αναστολή των κυτταροκινών που προάγουν την ίνωση, όπως ο παράγοντας TGF-β (transforming growth factor-β)^{4,5}.

Για πρώτη φορά ο θεραπευτικός ρόλος της IFN-γ-1b στην πνευμονική ίνωση μελετήθηκε από τον Ziesche και τους συνεργάτες του⁶. Η κλινική εμπειρία ωστόσο παραμένει περιορισμένη. Δύο τυχαίοποιημένες κλινικές μελέτες^{7,8} και μια μετα- ανάλυση⁹ έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα στην επιβίωση ασθενών με ήπια και μετρίου βαθμού βαρύτητας νόσο, μετά τη θεραπεία με IFN-γ-1b συγκορηγούμενη με χαμηλές δόσεις κορτικοστεροειδών.

Η πιθανή θεραπευτική δράση της IFN-γ-1b εξηγήθηκε στην μελέτη του Ziesche και των συνεργατών του, μέσω της άμεσης δράσης της στα επίπεδα του mRNA, του TGF-β1 καθώς και του CTGF⁶. Ωστόσο, από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας^{10,11}, αλλά και από άλλες μελέτες διαφορετικών ομάδων¹² δεν επιβεβαιώνεται αυτή η δράση, παρά μόνο φαίνεται ότι ίσως η IFN-γ-1b δρα μέσω εναλλακτικών μονοπατιών όπως αυτό της αγγειογένεσης^{11,12,15} και των Th1/Th2 restore^{13,14}.

Βέβαια, η μακροχρόνια επίδραση της IFN-γ-1b σε κλινικό και μοριακό επίπεδο δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Στη μελέτη αυτή σας παραθέτουμε τη δική μας εμπειρία από τη μελέτη τριών ασθενών με Ι.Π.Ι. ήπιας και μετρίου βαρύτητας οι οποίοι έλαβαν IFN gamma-1b για 4-7 χρόνια.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς - Θεραπευτικό σχήμα

Και οι τρεις ασθενείς της μελέτης μας, συμμετείχαν στην ομάδα της τυχαίοποιημένης μελέτης για την IFN-γ-1b⁸. Οι ασθενείς συνέχισαν να λαμβάνουν IFN-γ-1b (200 μg υποδορίως τρεις φορές την εβδομάδα) και χαμηλή δόση πρεδνιζολόνης (10 mgr καθημερινά) και μετά το πέρας των δυο ετών της μελέτης για 4-7 χρόνια⁸. Όλοι οι ασθενείς είχαν ιστολογικά τεκμηριωμένη διάγνωση της νόσου με ανοιχτή βιοψία πνεύμονα. Οι ασθενείς που παρουσιάζονται στη μελέτη είναι οι ασθενείς που επέζησαν μετά το πέρας της μελέτης⁸ και ελάμβαναν θεραπεία στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ηρακλείου.

Εκτίμηση Ασθενών

Οι ασθενείς εκτιμήθηκαν κατά την έναρξη της αγωγής και στη συνέχεια ετησίως από τον πρώτο έως και τον πέμπτο χρόνο θεραπείας, σύμφωνα με τις οδηγίες της ATS/ERS¹⁶. Η κλινική ανταπόκριση στην αγωγή εκτιμήθηκε με βάση: α) την συμπτωματολογία (δύσπνοια, βήχας), β) τις λειτουργικές δοκιμασίες των πνευμόνων (PFTs), και γ) την απεικόνιση μέσω αξονικής τομογραφίας θώρακα υψηλής ευκρίνειας (HRCT) (TID).

Αξιολόγηση των Απεικονιστικών Δεδομένων

Η εκτίμηση των αξονικών τομογραφιών πραγματοποιήθηκε από δυο ακτινολόγους. Έξι προκαθορισμένα επίπεδα τομών χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις HRCT: το επίπεδο των αγγειακού πλέγματος, το επίπεδο του αορτικού τόξου, το επίπεδο της τρόπιδας, το επίπεδο των πνευμονικών πυλών, το επίπεδο σύγκλισης των πνευμονικών φλεβών και το επίπεδο του δεξιού διαφράγματος. Οι τομές που ελήφθησαν ήταν πάχους 1mm και χρόνου σάρωσης 1 ως 2 δευτερολέπτων με κρατημένη την αναπνοή, στο τέλος της εισπνοής. Η μέση έκταση της απεικονιζόμενης παθολογίας σε κάθε επίπεδο (εκφρασμένη σαν ποσοστό της παθολογικής περιοχής για κάθε τομή) καταγράφηκε

σε ποσοστό 5%. Η βαθμολόγηση των 6 HRCT τομών προστέθηκε και διαιρέθηκε με το σύνολο των τομών για τον υπολογισμό του μέσου όρου της κάθε μεταβλητής. Η μέση τιμές αυτών των ποσοστών για κάθε ασθενή αποτελούν το Συνολικό Σκορ της Διάμεσης Νόσου (Total Interstitial Disease Score-TID). Η ίδια μέθοδος βαθμολόγησης των HRCT έχει χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενες μελέτες με καλούς συσχετισμούς με τις παραμέτρους των πνευμονικών λειτουργικών δοκιμασιών^{17,18}. Η βαθμολόγηση κάθε τομής και τα TID έγιναν στην αρχή της μελέτης, πριν τη λήψη της φαρμακευτικής αγωγής, αλλά και ανά έτος μέχρι το τέλος της μελέτης. Η βαθμολόγηση των HRCT τομών περιλάμβανε τις ακόλουθες ακτινολογικές απεικονίσεις: α) εικόνα θολής υάλου χωρίς παρουσία βρογchieκτασιών ή βρογchioλεκτασιών, β) λεπτή δικτυωτή διάταξη με περιοχές θολής υάλου και βρογchieκτασίες και βρογchioλεκτασίες, γ) εικόνα μελικυρήθρας. Η συμμετοχή της βλάβης του πνευμονικού παρεγχύματος ταξινομήθηκε ως 0-20%: ήπια (grade 1), 21-40%: μέτρια (grade 2), >40%: σοβαρή (grade 3).

Μοριακή Ανάλυση

Για την εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των m-RNAs των TGF- β 1, CTGF και IFN- γ , μελετήθηκε πνευμονικός ιστός από ανοικτή βιοψία πνεύμονα αρχικά και ιστοτεμάχια από διαβρογχική βιοψία 24 μήνες μετά την έναρξη της αγωγής¹⁰. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους -80°C σε διάλυμα αζώτου. Για την ανάλυση της έκφρασης του ολικού m-RNA χρησιμοποιήθηκε το RNeasy mini Kit (Qiagen Extraction Kits, QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Ο σχεδιασμός των εκκινήτων της PCR έγινε μέσω της αλληλουχίας του cDNA του ανθρώπινου TGF- β 1, CTGF, IFN- γ και των (G3PDH) γονιδίων (GenBank Accession nos. NM_000660, NM_001901, J00219 and NM_002046). Η απομόνωση του cDNA και η ανάστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) από 2 mg ολικού RNA, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το κάθε πείραμα RT-PCR για κάθε γονίδιο επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο πρώτος ασθενής ήταν 55 ετών, καπνιστής με ιστορικό δύσπνοιας προσπάθειας από εξαμήνου. Έλαβε αγωγή με IFN- γ -1b και χαμηλές δόσεις πρεδνιζολόνης. Έπειτα από πέντε χρόνια θεραπείας, παρατηρήθηκε σταθεροποίηση του σταδίου της δύσπνοιας, του βήχα καθώς και της ανοχής στην άσκηση. Στις πνευμονικές λειτουργικές

δοκιμασίες υπήρξε σταθερότητα στην ταχέως εκπνεόμενη ζωτική χωρητικότητα (FVC), από 81,4%, σε 70,7%, ενώ η διαχυτική ικανότητα (TLCO), παρουσίασε επιδείνωση, από 78,7% σε 50,6%. Υπήρξε ωστόσο βελτίωση στην ακτινολογική εικόνα του ασθενούς, με τον TID δείκτη να υποχωρεί από 39.1, στο 23.3 (εικόνα 1A, 1B). Στα τέσσερα χρόνια αγωγής, ο ασθενής δεν εμφάνισε αναπνευστική ανεπάρκεια (Πίνακας 1).

Ο δεύτερος ασθενής ήταν 63 ετών, μη-καπνιστής, με μη παραγωγικό βήχα από έτους. Έλαβε IFN- γ -1b και χαμηλές δόσεις πρεδνιζολόνης για επτά χρόνια και εμφάνισε σχετική σταθερότητα στην κλινική εικόνα (δύσπνοια, βήχα, ανοχή στην άσκηση), στις λειτουργικές δοκιμασίες (η FVC από 69% παρέμεινε στο 62.5% και η TLCO από 63.1%



FIGURE 1A. HRCT απεικόνιση στο επίπεδο 3 πριν τη θεραπεία του πρώτου ασθενή



FIGURE 1B. HRCT απεικόνιση στο επίπεδο 3 μετά τη θεραπεία του πρώτου ασθενή (πέντε χρόνια μετά).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. PFTs και HRCT scores του πρώτου ασθενή, πριν και μετά τη θεραπεία με IFN-γ-1b σε διαφορετικές χρονικές στιγμές

	Baseline	1st year	2nd year	3rd year	4th year	5th year
FVC % pred	81.4	82.1	82.8	78.3	76.7	70.7
TLCO % pred	78.7	75.1	67.3	49.5	53.7	50.6
PO ₂ (mmHg)	69	70	75	73	67	66
TID score	39.1		38.5			23.3

TID = total interstitial disease score

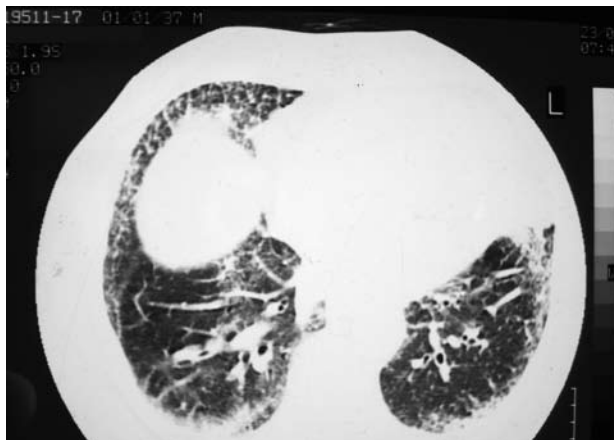


FIGURE 2A. HRCT απεικόνιση στο επίπεδο 6 πριν μετά τη θεραπεία του δεύτερου ασθενή.

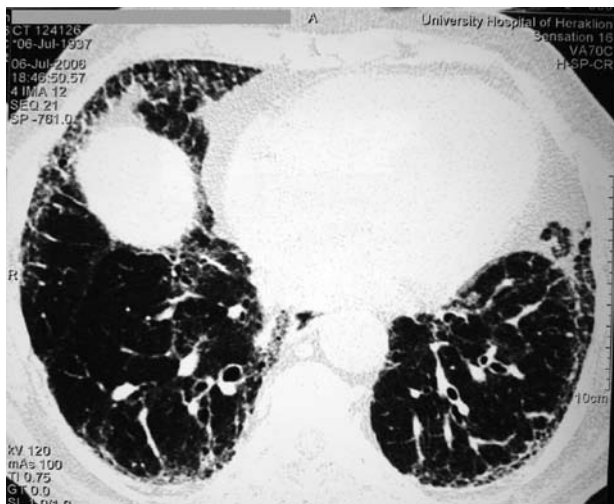


FIGURE 2B. HRCT απεικόνιση στο επίπεδο 6 μετά τη θεραπεία του δεύτερου ασθενή.

υποχώρησε στο 54,1%), στα ακτινολογικά ευρήματα (TID score από 44 μειώθηκε στο 30) (Εικόνα 2A, 2B) και στην ανταλλαγή αερίων (το pO₂ από 80 mmHg υποχώρησε στα 72 mmHg) (Πίνακας 2).

Ο τρίτος ασθενής ήταν 71 ετών, καπνιστής (50 p/yr), με συνοδό δύσπνοια προσπάθειας από εξαμήνου. Έλαβε IFN-gamma-1b και χαμηλές δόσεις πρεδνιζολόνης για τέσσερα χρόνια και εμφάνισε επιδείνωση της νόσου. Στις λειτουργικές δοκιμασίες πνευμόνων παρουσίασε επιδείνωση της FVC από 91% σε 65.5%, ενώ η διαχυτική του ικανότητα (TLCO), υποχώρησε από το 88.9%, στο 43.8%. Ο ασθενής εμφάνισε αναπνευστική ανεπάρκεια, με επιδείνωση των ακτινολογικών του ευρημάτων και το TID score αυξήθηκε από 31 σε 52 (Πίνακας 3) (Εικόνα 3A, 3B).

Σε γενικές γραμμές, όλοι οι ασθενείς ανέχτηκαν την

TABLE 2. Pulmonary function tests (PFTs) and high resolution computed tomography (HRCT) scores of patient 2, before and after treatment with IFN-γ-1b at different time points

	Baseline	1 st year	2 nd year	3 rd year	4 th year	5 th year	6 th year	7 th year
FVC % pred	69.0	80.7	85.1	83.0	77.5	59.1	70.6	62.5
TLCO % pred	63.1	82.5	76.0	68.5	56.7	46.7	53.6	54.1
pO ₂ (mmHg)	80	78	79	75	76	73	72	72
TID	44.1		40.6	38.3			30	

TID = total interstitial disease score



FIGURE 3A. HRCT απεικόνιση στο επίπεδο 4 πριν τη θεραπεία του τρίτου ασθενή.

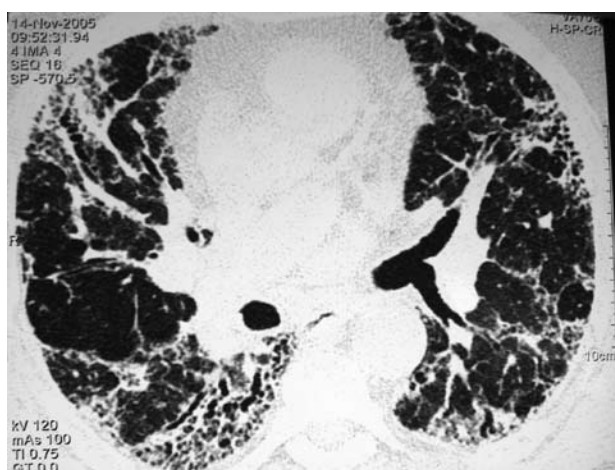


FIGURE 3B. HRCT απεικόνιση στο επίπεδο 4 μετά τη θεραπεία του τρίτου ασθενή.

TABLE 3. Pulmonary function tests (PFTs) and high resolution computed tomography (HRCT) scores of patient 3, before and after treatment with IFN- γ -1b, at different time points

	Baseline	1st year	2nd year	4th year
FVC % pred	91.0	74.9	75.0	65.5
TLCO % pred	88.9	80.2	68.0	43.8
PO ₂ (mmHg)	69	65	63	55
TID	31	38	45	52

TID = total interstitial disease score

αγωγή χωρίς ιδιαίτερες παρενέργειες και δεν εμφάνισαν οξεία έξαρση της νόσου.

Επίδραση του IFN- γ -1b στην έκφραση των TGF- β 1, CTGF και IFN- γ γονιδίων.

Πριν την έναρξη της θεραπείας, σε όλους τους ασθενείς παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του TGF- β 1 m-RNA και του CTGF m-RNA, αλλά μηδενική έκφραση του IFN- γ mRNA. Μετά από δυο χρόνια θεραπείας, τα επίπεδα έκφρασης του TGF- β 1 και του CTGF παρέμειναν σχεδόν σταθερά, ενώ παρατηρήθηκε επαγωγή του IFN- γ m-RNA (Σχήμα 4). Μετά από 24 μήνες θεραπείας με IFN- γ παρατηρήθηκε επαγωγή του ενδογενούς γονιδίου της IFN- γ και στους 3 ασθενείς που μελετήθηκαν.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μελετήσαμε την μακροχρόνια (4-7 χρόνια) επίδραση της χορήγησης IFN- γ -1b σε ασθενείς με ήπια και μέτρια Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση. Όλοι οι ασθενείς που έλα-

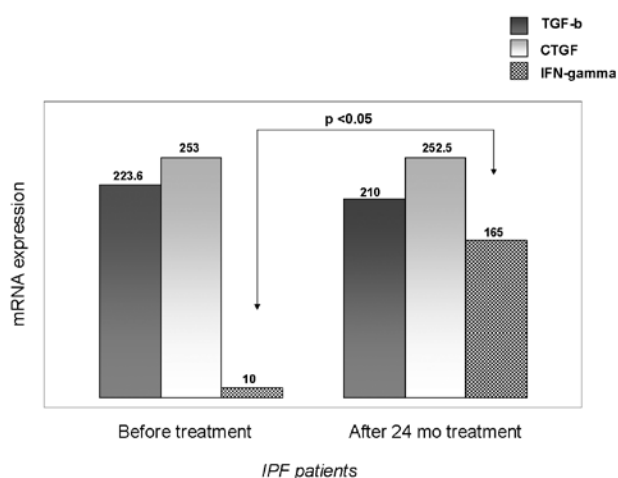


FIGURE 4. Το διάγραμμα με τις μπάρες αναπαριστά ποσοτικοποιημένα τα TGF- β 1, CTGF και IFN- γ mRNAs πριν (a) και μετά (b) τη θεραπεία.

* p-value < 0.05.

βαν την παραπάνω αγωγή δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες παρενέργειες. Σταθεροποίηση της νόσου, σύμφωνα με τα κριτήρια της ATS¹⁶, παρατηρήθηκε σε δύο από τους ασθενείς, με ταυτόχρονη βελτίωση της ακτινολογικής τους εικόνας. Ο τρίτος ασθενής παρουσίασε επιδείνωση τέσσερα χρόνια μετά τη διάγνωση της Ι.Π.Ι., χωρίς ωστόσο να μεταπέσει στο βαρύ στάδιο της νόσου (TLCO >40% της προβλεπόμενης). Η μοριακή ανάλυση έδειξε επαγωγή της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου της IFN- γ και στους τρεις ασθενείς μετά από 24 μήνες θεραπείας με IFN- γ .

Το σημαντικότερο εύρημα μας είναι η σταθεροποίηση της νόσου στους δύο ασθενείς και η μη εμφάνιση οξείας έξαρσης της νόσου. Δεύτερον, παρατηρήθηκε καλή ανοχή στην χορηγούμενη αγωγή από όλους τους ασθενείς^{7,8}. Ο Honore και οι συνεργάτες του²⁰ ανέφερε ωστόσο, την εμφάνιση αναπνευστικής ανεπάρκειας σε τέσσερις ασθενείς μετά την έναρξη αγωγής με IFN- γ -1b. Περιγράφηκε η εμφάνιση οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας μετά την έναρξη χορήγησης του φαρμάκου, με συμπτώματα, όπως η δύσπνοια, πυρετός, εμφάνιση νέων περιοχών με εικόνα θολής υάλου και ταχέως εξελισσόμενη υποξυγοναιμία, χωρίς ανταπόκριση στην αγωγή και με θανατηφόρα έκβαση και για τους τέσσερις ασθενείς της παραπάνω μελέτης²⁰. Ως πιθανότερος μηχανισμός θεωρήθηκε η αλλαγή στη διαπερατότητα της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων, κάτι που δεν φαίνεται να ισχύει στους ασθενείς με εκσεσημασμένη νόσο²¹. Αποτελεί βέβαια, μεγάλη πρόκληση η αποσαφήνιση των ακριβών αιτιών ταχείας επιδείνωσης της νόσου καθώς, συχνά παρατηρείται, εκτός

από τη φαρμακευτική τοξικότητα και η αυτόματη οξεία επιδείνωση σε ασθενείς με ήπια και μέτρια Ι.Π.Ι. εξαιτίας άλλων παραγόντων²².

Όσον αφορά στην ακτινολογική εικόνα των ασθενών της μελέτης παρατηρήθηκε σαφής βελτίωση σε δυο από αυτούς, μετά από 5 έτη θεραπείας με IFN-γ, κάτι που επιβεβαιώθηκε και με τη βελτίωση του TID δείκτη. Οι περιοχές με εικόνα θολής υάλου βελτιώθηκαν, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση της ασφαλούς χρήσης του φαρμάκου σε ήπιες και μέτριες μορφές της νόσου.

Η ανάλυση της έκφρασης των m-RNAs των TGF, CTGF και IFN-γ γονιδίων είναι παρόμοια με τα αποτελέσματα προηγούμενων δικών μας μελετών¹⁰, αλλά και άλλων εργαστηρίων¹². Ο παράγοντας IFN-g-1b, κυτταροκίνη υψηλής συγγένειας με τη φυσική IFN-g, κατέχει αντιμικροβιακές, αντιινωτικές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες και επάγει την Th1 ανοσολογική απάντηση. Η Th1 απάντηση χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση της IFN-g, της Ιντερλευκίνης-12 (IL-12) και Ιντερλευκίνης-18 (IL-18)¹³. Έτσι, η εξωγενής χορήγηση του παράγοντα IFN-g-1b στην Ιδιοπαθή Πνευμονική Ίνωση διαμέσου της εκτροπής της κυτταρικής ανοσίας προς Th1 απάντηση, δύναται να επάγει την έκφραση της ενδογενούς IFN-g.

Επίσης, ο Strieter και συνεργάτες με μια τυχαιοποιημένη, διπλή τυφλή μελέτη με τη συμμετοχή 32 ασθενών με Ι.Π.Ι., υποστηρίζει ότι η INF-γ ενισχύει τη δράση μορίων τα οποία σχετίζονται με την αντιμικροβιακή άμυνα και την αγγειογένεση¹². Μετά από την χορήγηση INF-γ-1b για διάστημα έξι μηνών παρατηρήθηκαν αλλαγές στη δράση των αγγειογενετικών και αγγειοστατικών κυτταροκινών αναδεικνύοντας τις θετικές επιδράσεις της INF-γ-1b στη διαδικασία της ίνωσης¹². Μπορεί επιπλέον να καταστείλει την δράση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, την δράση των αυξητικών παραγόντων TGF, PDGF, της πρωτεΐνης ENA-78/CXCL5, των Ιντερλευκινών IL-8, IL-4, IL-13, και να επάγει την έκφραση των IFN-inducible CXC χυμοκινών (MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, ITAC/CXCL)^{11,12}. Οι Τζωρτζάκη και συν¹⁰ σε τυχαιοποιημένη, προοπτική ανοικτή μελέτη σε 14 ασθενείς με Ι.Π.Ι., οι οποίοι έλαβαν

INF-γ-1b ή κολχικίνη, δεν παρατήρησαν μεταβολή στην έκφραση των TGF-β1 και CTGF στην ομάδα που λάμβανε θεραπεία με IFN-γ-1b, όπως αναφέρεται και στη μελέτη του Strieter και των συνεργατών του¹². Η παρούσα μελέτη συμμερίζεται εν μέρει τα αποτελέσματα του Ziesche, ο οποίος αναφέρει θετικές επιδράσεις της IFN-γ-1b σε ασθενείς οι οποίοι δεν εξέφραζαν το γονίδιο της πριν την έναρξη της θεραπείας⁶.

Πολλές είναι οι μελέτες που ερευνούν τους παθογενετικούς μηχανισμούς της Ι.Π.Ι αλλά και τον μηχανισμό δράσης της IFN-γ-1b in vivo²³. Η IFN-γ-1b μειώνει τη δράση μορίων που σχετίζονται με τη διεργασία της ίνωσης, της φλεγμονής και της αγγειογένεσης, ενώ ενισχύει τη δράση μορίων που συμμετέχουν στην αντιμικροβιακή άμυνα, την ενδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος και την αντι-αγγειογένεση. Η βελτίωση του δείκτη επιβίωσης έχει πλέον δημοσιευτεί από τρεις ελεγχόμενες κλινικές μελέτες θεραπείας με IFN-γ-1b ασθενών με Ι.Π.Ι. Ωστόσο, η κλινική μελέτη INSPIRE (International Study of Survival Outcomes in Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Interferon gamma-1b Early Intervention) η οποία πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με ήπια και μέτρια Ι.Π.Ι. απέτυχε να επιβεβαιώσει κάτι ανάλογο και διεκόπη πριν την ολοκλήρωσή της (μη δημοσιευμένα στοιχεία).

Πιστεύουμε ότι η θανατηφόρος αυτή νόσος, πολλές φορές με θνησιμότητα υψηλότερη από πολλά είδη καρκίνου²⁴, απαιτεί πολύπλευρη αντιμετώπιση, καθώς στην παθογένεια της εμπλέκονται πολύπλοκοι και όχι πλήρως κατανοητοί μηχανισμοί. Η παρούσα μελέτη, αλλά και προηγούμενες αναφορές^{8,10}, υποδεικνύουν ότι η θεραπεία με IFN-γ-1b θα μπορούσε να έχει θετικά αποτελέσματα τουλάχιστον σε συγκεκριμένους ασθενείς με ήπια και μέτριας βαρύτητας Ι.Π.Ι επάγοντας την έκφραση του ενδογενούς γονιδίου της IFN-γ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(Βλέπε αγγλικό κείμενο)

Clinical, radiological and molecular effects in three patients with idiopathic pulmonary fibrosis after long-term treatment with interferon gamma-1b

Athanasia Proklou¹,
Foteini Economidou¹,
Katerina M. Antoniou,
Eleni G. Tzortzaki¹,
Argyro Voloudaki²,
Katerina Malagari³,
Nikolaos M. Siafakas¹

¹Department of Thoracic Medicine, Medical School, University of Crete

²Department of Radiology, Medical School, University of Crete

³Department of Radiology, Medical School, University of Athens

Key words:

- Idiopathic Pulmonary Fibrosis,
- Interferon gamma-1b,
- Treatment

Correspondence:

Nikolaos Siafakas MD, PhD
Professor of Thoracic Medicine
Department of Thoracic Medicine
University of Crete, Medical School
71110 Heraklion Crete Greece
Tel.: (30) 2810 392433, Fax: (30) 2810542650
E-mail: pneumon@med.uoc.gr

SUMMARY. **BACKGROUND:** Interferon gamma-1b (IFN- γ -1b), an antifibrotic agent, has been proposed as a novel therapeutic agent for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). The long-term clinical and molecular effects of this agent are still unknown. Experience with three IPF patients treated with IFN- γ -1b for 4-7 consecutive years is reported. **OBJECTIVES:** Three patients with histologically proven IPF were studied prospectively. They received IFN- γ -1b 200 μ g subcutaneously three times weekly, along with low-dose prednisolone. The patients were monitored for at least four years according the ATS/ERS criteria and the appearance of the lesions on high resolution computed tomography (HRCT). **METHODS:** Using RT-PCR assay, the transcription levels of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), connective tissue growth factor (CTGF), and interferon- γ (IFN- γ) genes in lung tissue were evaluated before, and after two years of treatment. **RESULTS:** Treatment was well tolerated and no acute exacerbation of the disease was observed in any patient. Pulmonary fibrosis remained stable in terms of symptoms and pulmonary function tests (PFTs), and improvement in HRCT scoring was detected in two of the three patients. Marked mRNA expression of TGF- β 1 and CTGF, but complete lack of IFN- γ was detected in fibrotic lung tissue at baseline. After two years of treatment, all three patients exhibited increased expression of the IFN- γ gene ($p < 0.05$), while TGF- β 1 and CTGF transcriptional levels had not changed. **CONCLUSIONS:** Long-term treatment with IFN- γ -1b in patients with mild-to-moderate IPF appears to be safe. In two of the three patients monitored, the disease was stabilized, probably by enhancement of the expression of the IFN- γ endogenous gene. *Πνεύμων* 2009, 22(2):162-168.

INTRODUCTION

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an interstitial lung disease characterized by a fibroproliferative response with only minor signs of inflammation, and it almost always causes rapid fibrotic destruction of the lung¹. It is a progressive, terminal condition for which neither amelioration of disease activity nor prolongation of survival is achieved with conventional therapy with corticosteroids and cytotoxic drugs². The prognosis is poor, with mortality greater than that of certain cancers³.

Interferon gamma-1b (IFN- γ -1b) has several potential antifibrotic actions, including inhibition of fibroblast proliferation and collagen synthesis, promotion of fibroblast apoptosis and inhibition of profibrogenic cytokines, such as transforming growth factor- β ^{4,5}.

The first observation showing therapeutic effectiveness of IFN- γ -1b in IPF was reported in a small study of Ziesche et al⁶. Clinical experience, however, has been limited to two randomized clinical trials^{7,8} and a meta-analysis⁹ that demonstrated survival benefit in patients with mild-to-moderate disease treated with IFN- γ -1b and low-dose corticosteroids.

The possible therapeutic effect of IFN- γ -1b was explained by Ziesche and coworkers by the direct effect of this agent on mRNA levels of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and connective tissue growth factor (CTGF)⁶. However, studies by the authors¹⁰⁻¹¹ and others from different groups¹² failed confirm the above data, indicating that IFN- γ -1b may act through alternative pathways, such as Th1/Th2 restoration^{13,14} and angiogenesis^{11,12,15}.

The long-term clinical and molecular effects of IFN- γ -1b are still unknown. In this paper, the experience with three patients with IPF treated with IFN- γ -1b for 4-7 consecutive years is reported.

METHODS

Patients and Treatment

All three patients, treated at the Department of Thoracic Medicine of the University Hospital of Heraklion, were included in the IFN- γ -1b group of large randomised clinical trial⁸ and they had signed informed consent, and the study had IRB approval from the study institution. The patients continued to receive IFN- γ -1b (200 μ g sc three times weekly) and low dose prednisolone (10 mg daily) after the two-year treatment period of the study⁸. All three patients had a histologically confirmed pattern of usual interstitial pneumonia (UIP) on surgical open

lung biopsy. The condition of the three patients was stabilized/improved at the end of the study.⁸

Patient evaluation

The patients were monitored and outcome was evaluated according to the established ATS/ERS criteria¹⁶ at baseline and after 1, 2, 3, 4 and 5 years of treatment. The assessment of the clinical response of pulmonary fibrosis was based on:

- a) symptomatology (dyspnoea, cough),
- b) pulmonary function tests (PFTs), and
- c) imaging by high resolution CT scan scores, total interstitial disease score (TID).

Symptomatology, PFTs and TID score were measured at baseline and after every year of therapy and classified as improved, stable or deteriorated.

HRCT evaluation: Two radiologists, blinded to the clinical functional data and type of treatment, examined the HRCT images. The HRCT slices were evaluated at six predetermined levels: the vascular pedicle, the aortic arch, the tracheal carina, the pulmonary hilum, the pulmonary venous confluence, and the level of right diaphragm. The scans were performed with 1mm thickness and 1 to 2 sec scanning time during breath holding at end of inspiration. The mean total extent of involvement of interstitial abnormality at each of the defined levels, expressed as a percentage of the area affected at each given slice, at the level of 5% was recorded. Scores from the 6 HRCT slices were summed and divided by the total number of slices to calculate the average score of the extent of each of the variables. The mean values of these percentages per patient represented the TID. This HRCT scoring had been applied in previous studies, with good correlation with parameters of lung function^{17,18}. Individual slice scores and TIDs were recorded from the HRCT at the beginning of the study before administration of treatment. The HRCT scoring included the extent of: a) ground glass opacities without evidence of bronchiolectasis and bronchiectasis (GG), b) fine reticulation including areas of ground glass opacities with coexisting bronchiolectasis and bronchiectasis (FR), and c) coarse reticulation-honeycombing (CR). Lung parenchyma involvement was classified as 0-20%: mild (grade 1), 21-40%: moderate (grade 2), >40%: severe (grade 3).

Molecular analysis

For the assessment of TGF- β 1, CTGF and IFN- γ transcription levels, open lung biopsies were made before

treatment, and transbronchial biopsies specimens were obtained at 24 months¹⁰. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C. Total RNA was prepared separately from all patients at different time points (baseline and 24 months). Total RNA was extracted by using the RNeasy mini Kit (Qiagen Extraction Kits, QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). The cDNA sequence of the human TGF- β 1, CTGF, IFN- γ and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) genes (GenBank Accession nos. NM_000660, NM_001901, J00219 and NM_002046) were used to design primers for PCR amplification of the corresponding cDNA fragments. The G3PDH gene served as the internal control. To this end, cDNA was synthesized by using the QIAGEN OneStepRT-PCR Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) from 2 mg of total RNA, using the reverse transcriptase mix provided with the kit, as described by the manufacturer. Relative quantities of mRNAs among different patients were calculated from three replicate RT-PCR experiments. Positive results were based on the presence of DNA bands of the expected size.

RESULTS

Patient 1 was a 55 year-old male smoker with six-month history of dyspnoea on exertion. He was treated with IFN- γ -1b and low dose prednisolone, and after five years of treatment reported stabilization of his dyspnoea, cough and exercise tolerance. On testing, the forced vital capacity (FVC) had gone from 81.4% to 70.7%, and there was deterioration in the transfer factor (DLCO), which from 78.7 % decreased to 50.6 % and a radiological improvement, with the TID score decreasing from 39.1 to 23.3 (Figures 1A, 1B). The patient did not develop respiratory insufficiency (Table 1) during the years of treatment.

Patient 2 was a 63 year-old male non-smoker with a one-year history of non productive cough. He was treated with IFN- γ -1b and low dose prednisolone and after seven years of treatment, he had stable disease according to the clinical symptoms (dyspnoea, cough and exercise tolerance) and to the PFTs (FVC from 69% remained at 62.5%, and DLCO from 63.1% remained at 54.1%), and the radiological findings showed improvement (the TID score decreased from 44 to 30) (Figures 2A, 2B) while on blood gases analysis the pO₂ decreased slightly from 80 mm Hg to 72 mm Hg (Table 2).

Patient 3 was a 71 year-old man, a current smoker (50 p/yrs), with a six-month history of dyspnoea on exertion. He was treated with IFN- γ -1b and low dose prednisolone,



FIGURE 1A. Patient 1, HRCT at baseline. Level 3: Tracheal carina: total interstitial disease score (TID) = 40.



FIGURE 1B. Patient 1, HRCT after 5 years. Level 3: Tracheal carina: total interstitial disease (TID) score = 25, attenuation of ground glass opacities, stability of reticulation.

TABLE 1. Pulmonary function tests (PFTs) and high resolution computed tomography (HRCT) scores of patient 1, before and after treatment with IFN- γ -1b in different time points

	Baseline	1st year	2nd year	3rd year	4th year	5th year
FVC % pred	81.4	82.1	82.8	78.3	76.7	70.7
TLCO % pred	78.7	75.1	67.3	49.5	53.7	50.6
PO ₂ (mmHg)	69	70	75	73	67	66
TID	39.1		38.5			23.3

TID = total interstitial disease score

but after four years of treatment, showed deterioration of the disease. The FVC and DLCO decreased from 91%

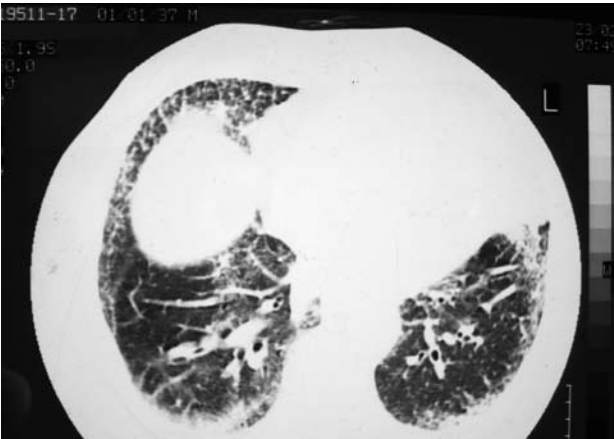


FIGURE 2A. Patient 2, HRCT at baseline. Level 6: Diaphragm carina: total interstitial disease score (TID) = 50.

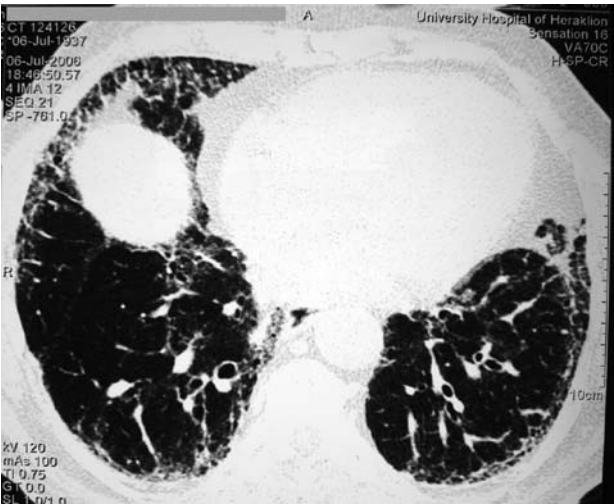


FIGURE 2B. Patient 2, HRCT after 6 years. Level 6: Diaphragm carina: total interstitial disease score (TID) =40, attenuation of ground glass opacities, increase of coarseness.

to 65.5%, and from 88.9% to 43.8% respectively. The TID score increased from 31 to 52 and the patient developed respiratory insufficiency (Table 3) (Figures 3A, 3B).

The treatment was well tolerated in all patients, with no adverse reactions. In addition, no acute exacerbation of their disease was observed.

The effects of IFN- γ -1b on the transcription of TGF- β 1, CTGF and IFN-gamma genes

Before treatment, all patients exhibited marked mRNA expression of TGF- β 1 and CTGF but not IFN- γ . The expression of TGF- β 1 and CTGF remained almost stable

TABLE 2. Pulmonary function tests (PFTs) and high resolution computed tomography (HRCT) scores of patient 2, before and after treatment with IFN- γ -1b at different time points

	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th	7 th
	Baseline year	year	year	year	year	year	year
FVC %	69.0	80.7	85.1	83.0	77.5	59.1	70.6
pred							62.5
TLCO %	63.1	82.5	76.0	68.5	56.7	46.7	53.6
pred							54.1
pO ₂ (mmHg)	80	78	79	75	76	73	72
TID	44.1		40.6	38.3			30

TID = total interstitial disease score



FIGURE 3A. Patient 3, HRCT at baseline. Level 4: Pulmonary venous confluence: total interstitial disease score (TID)= 35.

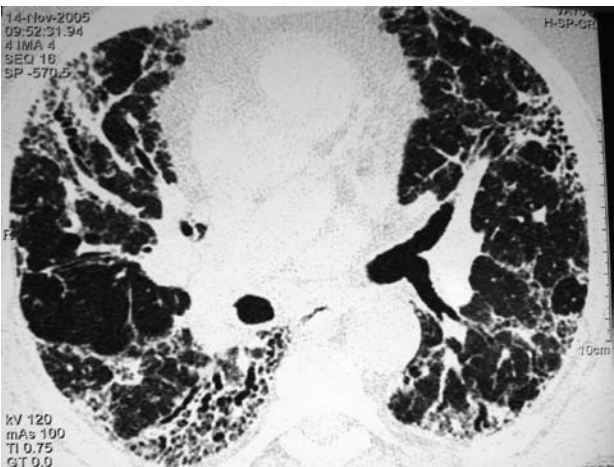


FIGURE 3B. Patient 3, HRCT after 4 years. Level 4: Pulmonary venous confluence: total interstitial disease score (TID) =70.

TABLE 3. Pulmonary function tests (PFTs) and high resolution computed tomography (HRCT) scores of patient 3, before and after treatment with IFN- γ -1b, at different time points

	Baseline	1st year	2nd year	4th year
FVC % pred	91.0	74.9	75.0	65.5
TLCO % pred	88.9	80.2	68.0	43.8
PO2 (mmHg)	69	65	63	55
TID	31	38	45	52

TID = total interstitial disease score

(non-noticeable differences) after treatment, but the expression of IFN- γ increased significantly after two years of treatment (figure 4). This observation indicated that the agent IFN- γ -1b enhanced the expression of the patients' endogenous genes.

DISCUSSION

The experience with long-term IFN- γ -1b treatment in patients with mild-moderate IPF is reported. To the authors' knowledge, the effects of the antifibrotic agent IFN- γ -1b after two years of treatment have not been reported.

In these patients the treatment was well tolerated, with no adverse reactions. In two of the three patients the disease process was stabilized according to the established criteria of IPF outcome evaluation¹⁶, while their

HRCT score improved. The third patient showed gradual deterioration of the disease, but still remained with moderate IPF (DLCO>40% pred) four years after diagnosis. The molecular analysis showed that agent IFN- γ -1b had enhanced the expression of the patients' endogenous genes after 24 months of treatment.

The response to treatment was favourable: Firstly, two patients showed stabilization of their disease, and no acute exacerbation of IPF was observed in any of the three patients; secondly, the treatment was well tolerated in all patients, in accordance with most previous reports^{7,8,19}, although Honore et al²⁰ reported respiratory failure and alveolar opacities in four IPF patients after initiation of IFN- γ -1b administration. These authors described four patients with IPF who rapidly developed acute respiratory distress syndrome shortly after the initiation of the drug, with dyspnoea, fever, the emergence of new diffuse ground-glass opacities and rapidly progressive hypoxaemia which showed no response to conventional treatment methods. The complications culminated in a fatal outcome due to irreversible respiratory failure in all four cases. Drug-induced alteration in transepithelial cell permeability was suggested as a possible pathogenetic mechanism. This possibility is considered more plausible in patients with severe disease²¹. However, as often in the case of possible drug toxicities, it is difficult to distinguish whether other processes were implicated in this event. Therefore, spontaneous acute disease exacerbation or other comorbidities should not be ruled out. Recent data suggest that rapid respiratory decompensation in patients with mild to moderate IPF is substantially more common than currently perceived²².

In addition, an improvement was observed in the HRCT score of two of the patients in the present study, with stabilization of their disease in terms of lung physiology, after five years of treatment with IFN- γ -1b. The HRCT analysis of the TID score showed that the ground glass opacities improved while the coarseness remained stable. The radiological findings further support the notion that the drug is safe in mild-to-moderate disease.

The molecular analysis supported previous findings by the authors^{10,11} and other laboratories¹². Strieter et al conducted a randomized double-blind placebo-controlled trial with 32 IPF patients, which supported the theory that INF- γ upregulates molecules associated with antimicrobial defence and antioangiogenesis¹². Changes observed in angiogenetic/angiostatic cytokines after 6 months of treatment with INF- γ -1b, as compared with placebo, suggest beneficial effects of INF- γ -1b on the process of

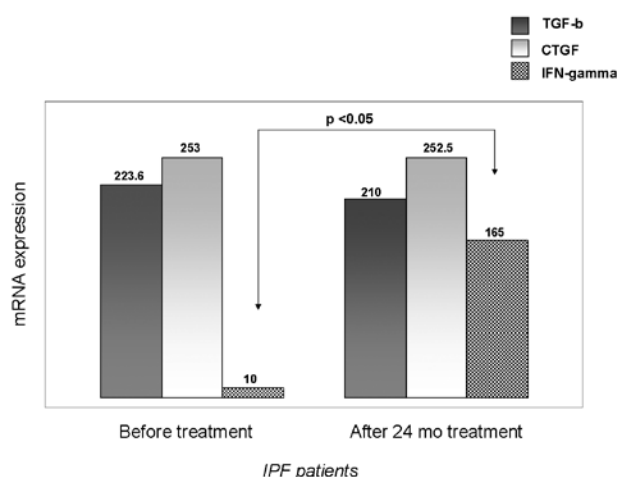


FIGURE 4. Bar graphs representing quantification of signal intensities (arbitrary units) for TGF- β 1, CTGF and IFN- γ mRNAs, before (a) and after (b) treatment of patients with interstitial pulmonary fibrosis (IPF).

* p-value < 0.05.

fibrosis¹². The authors are of the opinion that the induction of the endogenous gene may be the result of Th1 shift in the immunologic response observed in several studies¹¹⁻¹³. Tzortzaki et al¹⁰, in a randomized, prospective open-label study in 14 IPF patients treated with INF- γ -1b or colchicines, did not demonstrate any consistent effect of INF- γ -1b treatment on mRNA expression of TGF- β 1 and CTGF, in accordance with the report by Strieter et al¹². In addition, current data support in part Ziesche's findings of beneficial drug effects in patients who did not express INF- γ gene in their tissue before therapy⁶.

There are now reports of several clinical studies that provide new insights into the pathogenesis of IPF and the effects of INF- γ -1b in vivo²³. INF- γ -1b downregulates molecules associated with fibrosis, inflammation, and angiogenesis, while it reinforces the actions of molecules associated with anti-microbial defence, immunostimulation, and antiangiogenesis. Improved survival has now been suggested by the results of three controlled clinical trials of INF- γ -1b in the treatment of IPF. These findings indicate a biologically plausible scenario for the mechanism of action of INF- γ -1b in prolonging survival in IPF. However, the long term clinical trial INSPIRE (International Study of Survival Outcomes in Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Interferon gamma-1b Early Intervention) in mild-to-moderate IPF failed to verify the above-noted survival benefit and was interrupted prematurely (unpublished data).

The authors believe that no single agent is sufficient to modify this fatal disease. Multiple interactive pathways are involved in the currently unknown pathogenesis of IPF, a disease with mortality greater than that of many types of cancer²⁴. This phenomenon could lead us to introduce an "oncological" approach to the treatment of this disorder.

However, earlier^{8,10} and current data support the notion that INF- γ -1b treatment could be beneficial in a selected group of patients with mild-to-moderate IPF, probably by enhancing the expression of the endogenous INF- γ gene.

REFERENCES

1. Selman M, King TE, Pardo A; American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*. 2001;134:136-51
2. Bouros D, Antoniou KM. Current and future approaches in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Eur Respir J* 2005; 16 :693-703
3. American Thoracic Society. ATS/ERS International Multidisciplinary Consensus Classification of Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304
4. Antoniou KM, Ferdoutsis E, Bouros D. Interferons and their application in the diseases of the lung. *Chest* 2003;123: 209-216
5. Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin –mouse model of lung fibrosis: Down regulation of TGF- β and procollagen III GENE Expression and I. *Experimental Lung Research*. 1995; 21:791-80
6. Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, Petkov V, Block LH. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1999;341:1264-1269
7. Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, Starko K, Noble PW, Schwartz DA, King TE Jr; Idiopathic Pulmonary Fibrosis Study Group. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2004;350:125-133
8. Antoniou KM, Nicholson AG, Dimadi M, Malagari K, Latsi P, Rapti A, Tzanakis N, Trigidou R, Polychronopoulos V, Bouros D. Long-term clinical effects of interferon gamma-1b and colchicine in Idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2006;28:496-504.
9. Bajwa EK, Ayas NT, Schulzer M, Mak E, Ryu JH, Malhotra A. Interferon gamma-1b therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: a metanalysis. *Chest* 2005;128:203-206
10. Tzortzaki EG, Antoniou KM, Zervou MI, Lambiri I, Koutsopoulos A, Tzanakis N, Plataki M, Maltezas G, Bouros D, Siafakas NM. Effects of antifibrotic agents on TGF- β 1, CTGF and INF- γ expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2007; 101:1821-1829
11. Antoniou KM, Tzanakis N, Tzortzaki EG, Malagari K, Koutsopoulos AV, Wells AU, Siafakas NM. Different angiogenic CXC chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid after Interferon gamma-1b therapy in idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21: 840-844
12. Strieter RM, Starko KM, Enelow RI, Noth I, Valentine VG; Idiopathic Pulmonary Fibrosis Biomarkers Study Group. Effects of interferon gamma-1b on biomarker expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:133-140
13. Antoniou KM, Alexandrakis MG, Sfiridaki K, Tsiligianni I, Perisinakis K, Tzortzaki EG, Siafakas NM, Bouros DE. Th1 cytokines (IL-12 and IL-18) in bronchoalveolar lavage fluid before and after treatment with interferon gamma-1b or colchicine in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21: 105-110
14. Antoniou KM, Tzortzaki EG, Alexandrakis MG, Zervou M, Tzanakis N, Sfiridaki K, Bouros DE, Siafakas NM. Investigation of IL-18 and IL-12 in induced sputum of patients with IPF before and after treatment with interferon gamma-1b. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2005; 22:204-9
15. Bouros D, Antoniou KM, Siafakas NM. Does Interferon gamma-1b therapy improve survival in IPF via an angiogenetic pathway?

- Chest; 7 December 2005 (electronic letter to the editor)
16. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International Consensus Statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:646-64
 17. Wells AU, King AD, Rubens MB, Cramer D, du Bois RM, Hansell DM. Lone cryptogenic fibrosing alveolitis: a functional-morphologic correlation based on extent of disease on thin-section computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1367-1375
 18. Wells AU, Hansell DM, Rubens MB, Cullinan P, Black CM, du Bois RM. The predictive value of appearances on thin-section computed tomography in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1993; 148: 1076-1082
 19. King TE Jr, Safrin S, Starko KM, Brown KK, Noble PW, Raghu G, Schwartz DA. Analyses of efficacy end points in a controlled trial on interferon- γ -1b for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 2005; 127: 171-177
 20. Honori I, Nunes H, Groussard O, Kambouchner M, Chambellan A, Aubier M, Valeyre D, Crestani B. Acute respiratory failure after interferon- γ therapy of end-stage pulmonary fibrosis. *Am Respir Crit Care Med* 2003; 167:953-957
 21. Selman M. A dark side of interferon- γ in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis? *Am Respir Crit Care Med* 2003; 167:945-946 [editorial]
 22. Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, Starko KM, Bradford WZ, King TE Jr, Flaherty KR, Schwartz DA, Noble PW, Raghu G, Brown KK. The clinical course of patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann Intern Med* 2005; 142:963-967
 23. Bouros D, Antoniou KM, Tzouvelekis A, Siafakas NM. Interferon gamma-1b for the treatment of IPF. *Expert Opinion* 2006
 24. Antoniou KM, Pataka A, Bouros D, Siafakas NM. Pathogenetic pathways and novel pharmacotherapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20:453-61.

Μέθοδοι τεκμηρίωσης της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας νέων φαρμακοτεχνικών μορφών εισπνεόμενων φαρμάκων που εμπεριέχουν κορτικοστεροειδές και/ή β2-διεγέρτη

Δημοσθένης Μπούρος

Καθηγητής Πνευμονολογίας ΔΠΘ,
Διευθυντής Σύνταξης,
Διευθυντής Πνευμονολογικής Κλινικής
και Τομέα Παθολογίας, Πανεπιστημιακό
Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης και Ιατρικό
Τμήμα ΔΠΘ

Λέξεις κλειδιά:

- Θεραπευτική ισοδυναμία,
- Εισπνεόμενο φάρμακο,
- Νέα φαρμακοτεχνική μορφή,
- Κορτικοστεροειδές,
- β2-διεγέρτης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η έγκριση νέων φαρμακευτικών μορφών από του στόματος εισπνεομένων προϊόντων που περιέχουν κορτικοστεροειδές και/ή β2-διεγέρτη, καθιστά αναγκαία την προσεκτική, αναλυτική και εκτενή αξιολόγηση όλων των προβλημάτων και ανησυχιών που υπάρχουν και που μπορεί να αφορούν την δοσολογία ή τη νέα φαρμακοτεχνική μορφή του φαρμάκου. Επιπλέον, είναι δύσκολο να αποδειχθεί η θεραπευτική ισοδυναμία προς ένα ήδη εγκεκριμένο προϊόν αναφοράς. Κι αυτό, διότι οι κλινικές μελέτες που χρησιμοποιούνται για την απόκτηση αδείας κυκλοφορίας, συχνά-λόγω λάθους στο σχεδιασμό τους-εμφανίζουν ανεπαρκή ευαισθησία μετρήσεων και συνεπώς έχουν εγγενή αδυναμία επιβεβαίωσης του στόχου τους, δηλαδή να αποδείξουν αδιαμφισβήτητα ότι το νέο προϊόν εμφανίζει τα ίδια ακριβώς χαρακτηριστικά ωφέλειας/κινδύνου με το εγκεκριμένο προϊόν αναφοράς. Ειδικά, για ευαίσθητους πληθυσμούς ασθενών, όπως παιδιών, εφήβων και ασθενών με σοβαρή νόσο, οι αδυναμίες αυτές δεν μπορεί να παραβλεφθούν καθώς μπορεί να ενέχουν σημαντικό κίνδυνο για τον ασθενή. *Πνεύμων 2009, 22(2):169-172.*

Αλληλογραφία:

Δημοσθένης Μπούρος
Πνευμονολογική Κλινική
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης
681 00 Αλεξανδρούπολη
Tel. / fax: 25510 76106
e-mail: bouros@med.duth.gr

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κλινική ανάπτυξη και υποβολή αίτησης κυκλοφορίας προς τις ρυθμιστικές αρχές μίας νέας φαρμακοτεχνικής μορφής ενός ήδη εγκεκριμένου φαρμάκου, επιτρέπεται σε τρίτους όταν η περίοδος «προστασίας» του ήδη εγκεκριμένου φαρμάκου, όπως αυτή καθορίζεται από το εμπορικό σήμα

και διπλώματα ευρεσιτεχνίας, έχει λήξει. Σε κάθε τέτοια περίπτωση επιβάλλεται να τεκμηριωθεί ότι η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της νέας φαρμακοτεχνικής μορφής είναι τουλάχιστον μη υποδεέστερη αυτής του ήδη εγκεκριμένου φαρμάκου.

Στα πλαίσια αυτής της τεκμηρίωσης χρησιμοποιείται ο όρος «**βιοϊσοδυναμία**», πού εμφανίζεται για πρώτη φορά επισήμως το 1984. Τότε, σύμφωνα με τον νόμο Hatch-Waxman, το FDA όρισε ότι «*βιοϊσοδύναμο είναι το φάρμακο το οποίο εμφανίζει απουσία σημαντικής διαφοράς ως προς την διαθεσιμότητα της δραστικής ουσίας στο σημείο δράσης του φαρμάκου*». Η βιοϊσοδυναμία μπορεί να τεκμηριωθεί επιστημονικά με βάση τη μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στον ορό, το χρόνο που απαιτείται μέχρι να επιτευχθεί η μέγιστη συγκέντρωση ή την AUC (περιοχή κάτω από την καμπύλη) της συγκέντρωσης στον ορό του φαρμάκου συναρτήσει του χρόνου [μελέτη φαρμακοκινητικής]¹. Η ιδιαιτερότητα² με τα τοπικώς στους βρόγχους δρώντα εισπνεόμενα φάρμακα έγκειται στο ότι η τεκμηρίωση της «**θεραπευτικής ισοδυναμίας**», που ορίζεται ως μη υποδεέστερη αποτελεσματικότητα και η παρεμφερής ασφάλεια, επιτυγχάνεται συνήθως με μελέτες φαρμακοδυναμικής. Και βέβαια, στην περίπτωση των εισπνεόμενων φαρμάκων, που εμπεριέχουν κορτικοστεροειδές (ICS) και β2-διεγέρτη μακράς δράσης (LABA), η τεκμηρίωση της μη υποδεέστερης αποτελεσματικότητας θα γίνει βάσει των μετρήσεων των φαρμακοδυναμικών παραμέτρων της πνευμονικής λειτουργίας (FEV₁, PEF)³. Αντιληπτό επίσης γίνεται, ότι η επιστημονική τεκμηρίωση της θεραπευτικής ισοδυναμίας για αυτή την κατηγορία φαρμάκων, καθίσταται ακόμη δυσχερέστερη αν ληφθεί υπ' όψιν ότι η φαρμακοδυναμική συμπεριφορά αυτών των παραγόντων είναι εξαιρετικά περίπλοκη. Συγκεκριμένα, αρχίζοντας από το μέγεθος των σωματιδίων, όταν αυτά έχουν μέγεθος μεγαλύτερο των 10μm, εναποτίθενται κυρίως στο στόμα και τον στοματοφάρυγγα, ενώ όταν είναι μικρότερα από 2,5μm φθάνουν στις κυψελίδες και στη συνέχεια αποβάλλονται με την εκπνοή χωρίς να εναποτίθενται στους βρόγχους. Μόνον τα σωματίδια με διάμετρο 2,5 έως 6μm θα επιτρέψουν την εναπόθεση του φαρμάκου στους αεραγωγούς και συνεπώς θα είναι τα πιο αποτελεσματικά⁴. Δυστυχώς, στην κλινική πράξη σήμερα, δεν υπάρχει κανένα σύστημα αεροσόλης, ή εκνεφώματος ξηράς σκόνης, που να παράγει ομοιόμορφα σωματίδια, στο κατάλληλο μέγεθος⁵. Πιο σημαντικό, τα χαρακτηριστικά του εκνεφώματος, και επομένως το «που» και «πόσο» φάρμακο εναποτίθεται εξαρτάται πλήρως από τη φαρμακοτεχνική μορφή, συμπεριλαμβανομένης της «εισπνευστικής» συσκευής⁵. Πέραν αυτού, παράγοντες

όπως η εισπνευστική ροή, αλλά και η τεχνική χρήσης της εισπνευστικής συσκευής, επηρεάζουν την αποτελεσματική εναπόθεση του φαρμάκου^{6,7}. Ακόμα και κάτω από τις ιδεωδέστερες συνθήκες, μόνον ένα ποσοστό 5% έως 30% του φαρμάκου εναποτίθεται στους πνεύμονες⁸. Το υπόλοιπο εισέρχεται στον οισοφάγο. Οι περισσότερες από τις μελέτες που αφορούν την κατανομή των ICS, έχουν πραγματοποιηθεί σε υγιείς εθελοντές. Όπως τονίζουν έγκυροι ειδικοί (Barnes, P.J.) «...παράγοντες όπως φλεγμονώδης νόσος των αεροφόρων οδών, απόφραξη αεροφόρων, η ηλικία του ασθενούς καθώς και συγχρηγούμενα φάρμακα, μπορούν να τροποποιήσουν την κατανομή της εισπνεόμενης δόσης. Επίσης, μπορεί να υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συχνότητα και το σύστημα χορήγησης του φαρμάκου»⁹.

Εκ των ανωτέρω συνάγεται ότι η θεραπευτική ισοδυναμία του υπό εξέταση φαρμάκου με το φάρμακο αναφοράς, θα πρέπει να τεκμηριώνεται με κατάλληλα σχεδιασμένες κλινικές μελέτες. Ο σχεδιασμός και ο τρόπος διαξαγωγής των κλινικών μελετών αυτού του είδους, απαιτεί πολύ αυστηρά επιστημονικά κριτήρια. Ακριβώς από το σημείο αυτό, πηγάζει ο σχετικός προβληματισμός. Προβληματισμός που εστιάζεται στην αδυναμία των περισσότερων μελετών, να αποδείξουν πέραν πάσης αμφιβολίας, ισοδύναμη ή μη υποδεέστερη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια μεταξύ του υπό εξέταση φαρμάκου και του φαρμάκου αναφοράς.

ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Μελέτες φαρμακοκινητικής

Το φάρμακο που έχει εναποτεθεί στις αεροφόρους οδούς, θα απορροφηθεί στη συστηματική κυκλοφορία. Επομένως μπορεί να γίνει έμμεσος υπολογισμός της εναποτεθείσης ποσότητας στους πνεύμονες (π.χ. μετά από αποκλεισμό του γαστρεντερικού συστήματος με ενεργό άνθρακα) και έλεγχο της φαρμακοκινητικής της δραστικής ουσίας στη συστηματική κυκλοφορία³. Δυστυχώς αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη τεκμηρίωση «ισοδύναμης αποτελεσματικότητας». Σύγκριση δηλαδή μίας δόσης, εφόσον έχει δειχθεί γραμμική συσχέτιση δόσης-αποτελέσματος μεταξύ διαφορετικών δόσεων. Το σημαντικό μειονέκτημα εν τούτοις έγκειται στο ότι η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον έμμεσο υπολογισμό της ποσότητας της δραστικής ουσίας που εναποτίθεται στους βρόγχους, όχι όμως το τόπο της εναπόθεσης, δηλαδή τους μικρούς, ή μεγαλύτερους βρόγχους³. Ως γνωστό, η περιοχική εναπόθεση εξαρτάται απόλυτα από το μέγεθος

των σωματιδίων του εκνεφώματος και αυτά με τη σειρά τους από τη φαρμακοτεχνική μορφή και την εισπνευστική συσκευή⁸. Ο προσεγγιστικός αυτός τρόπος υπολογισμού δεν μπορεί να αποκλείσει σημαντικές διαφορές αποτελεσματικότητας λόγω της διαφορετικής φαρμακοτεχνικής μορφής των ελεγχόμενων φαρμάκων¹⁰, ιδιαίτερα ανάμεσα σε ασθενείς με διαφορετικές νόσους (άσθμα, Χ.Α.Π) ή διαφορετικούς βαθμούς σοβαρότητας της νόσου. Συνεπώς, οι μελέτες φαρμακοκινητικής/ βιοδιαθεσιμότητας δεν μπορούν να ακυρώσουν την ανάγκη διεξαγωγής και καταλλήλων φαρμακοδυναμικών/κλινικών μελετών, όπως επιτάσσει η τελευταία Κατευθυντήρια Οδηγία³. Εν τούτοις, παραμένει σημαντική ανάγκη διερεύνησης, με μελέτες φαρμακοκινητικής, της γραμμικής αντιστοιχίας ανάμεσα στην δοσολογία και το κλινικό αποτέλεσμα πριν από την έναρξη των φαρμακοδυναμικών μελετών. Θα πρέπει, μέσω των φαρμακοκινητικών μελετών, να αποδειχθεί η αντιστοιχία/αναλογικότητα των διαφόρων δόσεων των υπό εξέταση φαρμάκων προς τα κλινικά αποτελέσματα. Όπως έχει καταδειχθεί σε τέτοιες περιπτώσεις, η απόδειξη αυτής της αντιστοιχίας/αναλογικότητας μεταξύ του υπό εξέταση φαρμάκου και του φαρμάκου αναφοράς, κατά τρόπον μη επιδεχόμενον αμφισβήτηση, υπαγορεύει την διενέργεια φαρμακοκινητικής μελέτης σε τουλάχιστον δύο δόσεις του υπό έλεγχο φαρμάκου και δύο δόσεις του φαρμάκου αναφοράς και ανάλυση των δεδομένων στον άξονα των Χ, αντί της παραδοσιακής ανάλυσης στον άξονα των Ψ^{3, 11}. Επί αποδείξεως γραμμικής αντιστοιχίας μεταξύ δόσεων-αποτελέσματος, οι μετέπειτα μελέτες φαρμακοδυναμικής σχεδιάζονται με σκοπό τη σύγκριση μίας μόνον δόσης, της υψηλότερης συνήθως, ώστε να επιτευχθεί ταυτόχρονη διασφάλιση της ασφάλειας και ανεκτικότητας των μεγαλύτερων δόσεων.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ

Ο προβληματισμός εστιάζεται στην αδυναμία των περισσότερων κλινικών μελετών φαρμακοδυναμικού χαρακτήρα, που διενεργούνται με σκοπό την τεκμηρίωση της «θεραπευτικής ισοδυναμίας» μεταξύ τοπικώς δρώντων εισπνεομένων φαρμάκων, να αποδείξουν μακράν οιασδήποτε αμφιβολίας ισοδύναμη ή μη υποδεέστερη αποτελεσματικότητα μεταξύ του «νέου φαρμάκου» και του «εγκεκριμένου φαρμάκου αναφοράς». Ο λόγος είναι απλός. Η όποια διαφορά μεταξύ «νέου» και «εγκεκριμένου» ως προς την υπό εξέταση πρωτεύουσα μεταβλητή αποτελεσματικότητας (π.χ. FEV₁, ή PEF) οφείλει να εμπεριέχεται στη διαφορά που προκαθορίζεται και που ορίζεται από τα όρια της κλινικής σημαντικότητας. Με απλά λόγια, για να

γίνει αποδεκτό ότι τα δύο φάρμακα δεν διαφέρουν πρέπει η όποια διαφορά τους να είναι μικρότερη σε μέγεθος από τη διαφορά / αλλαγή που είναι κλινικά σημαντική στον ασθενή^{12,13}. Ταυτόχρονα όμως για να εξετασθεί κατά πόσο τα δύο φάρμακα παρουσιάζουν ισοδύναμη ή μη υποδεέστερη αποτελεσματικότητα, πρέπει ο σχεδιασμός της μελέτης και ο υπό μελέτη πληθυσμός των ασθενών να επιτρέπουν την πλήρη εκδήλωση της αποτελεσματικότητας των δύο φαρμάκων³, ώστε τα δύο φάρμακα εν συνεχεία να εξετασθούν κατά πόσον πραγματικά είναι ισοδύναμα. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι ελλοχεύει ο κίνδυνος δύο μη δραστικά, ή μερικώς δραστικά, φάρμακα να δειχθούν ισοδύναμα. Κρίσιμο χαρακτηριστικό λοιπόν που αφορά τον σχεδιασμό τέτοιου είδους μελέτες, είναι η διάρκεια της θεραπείας για κάθε ασθενή που συμμετέχει. Ειδικότερα, για ένα προϊόν που περιέχει ICS, επιβάλλεται η διάρκεια της θεραπείας να είναι 8-12 εβδομάδες ανά ασθενή¹⁴. Όσον αφορά τον πληθυσμό των υπό μελέτη ασθενών, θα πρέπει κατά την έναρξη της μελέτης να παρουσιάζει επαρκή περιθώρια βελτίωσης της κύριας μεταβλητής, της αποτελεσματικότητας, έτσι ώστε να μπορούν αμφοτέρωτα τα φάρμακα να αξιολογηθούν επιτυχώς ως προς την κλινική ισοδυναμία τους κατά το τέλος της μελέτης.

Δύο συνθήκες πρέπει «ιεραρχικά» να εκπληρωθούν στη κατάλληλα σχεδιασμένη φαρμακοδυναμική μελέτη. Πρέπει πρώτα να δειχθεί ότι τα υπό εξέταση δύο φάρμακα είναι αποτελεσματικά. Δηλαδή, ότι χορηγούμενα στους ασθενείς της μελέτης αποφέρουν βελτίωση της νόσου που είναι κλινικά σημαντική για τον ασθενή. Εν συνεχεία πρέπει να αποδειχθεί ότι η όποια διαφορά μεταξύ των δύο φαρμάκων δεν είναι κλινικά σημαντική για τον ασθενή, ώστε να γίνει αποδεκτό ότι τα δύο φάρμακα είναι ισοδύναμα ως προς την πλήρη εκδήλωση της δράσης των. Επομένως, στο τέλος της μελέτης δεν αρκεί η διαφορά μεταξύ των δύο φαρμάκων να εμπεριέχεται στη διαφορά που προκαθορίζεται, αλλά ταυτόχρονα η βελτίωση που παρατηρείται στις ομάδες των ασθενών να είναι τουλάχιστον κλινικά σημαντική και άρα να είναι τουλάχιστον μεγαλύτερη σε μέγεθος από την παρατηρούμενη διαφορά μεταξύ των δύο φαρμάκων (που οφείλει να είναι εξ ορισμού μικρότερη από τη διαφορά / βελτίωση που είναι σημαντική για τον ασθενή). Διαφορετικά, δεν μπορεί να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο ότι παρόλο ότι η διαφορά των δύο φαρμάκων στη συγκεκριμένη μελέτη εμπεριέχεται στο προκαθορισθέν διάστημα ισοδυναμίας/ μη κατωτερότητας, τα δύο φάρμακα δεν είναι ισοδύναμα και πιθανώς το ένα είναι λιγότερο, ή και περισσότερο, αποτελεσματικό από το άλλο.

Στο πληθυσμό των ασθματικών που συμμετέχουν σε αυτού του είδους τις κλινικές μελέτες, ο ανωτέρω προβληματισμός είναι ο κανόνας. Διότι οι ασθενείς λαμβάνουν, όπως άλλωστε απαιτείται, κατάλληλη θεραπεία προ της εισόδου τους στη μελέτη και ως εκ τούτου παρουσιάζουν μικρά περιθώρια βελτίωσης κατά τη διάρκεια της μελέτης. Το αποτέλεσμα είναι ότι κατά κανόνα η ευρισκόμενη διαφορά μεταξύ των δύο φαρμάκων στο τέλος μιας τέτοιας μελέτης δεν είναι μικρότερη, ως όφειλε, από τη βελτίωση που παρουσίασαν οι ασθενείς από την αρχή έως το πέρας της μελέτης, αλλά μεγαλύτερη. Οι κλινικές «φαρμακοδυναμικές» μελέτες συχνά χαρακτηρίζονται, επομένως, από έλλειψη σχεδιαστικής ευαισθησίας, ένα γνωστό πρόβλημα, τα δε εξ αυτών κλινικά στοιχεία είναι ακατάλληλα να υποστηρίξουν την «θεραπευτική ισοδυναμία» των ελεγχόμενων εισπνεομένων φαρμάκων γιατί αποτυγχάνουν να αποδείξουν με εμπιστοσύνη ότι τα δύο φάρμακα είναι πραγματικά «όμοια».

ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η αξιολόγηση της συστημικής ασφάλειας για εμπεριέχοντα κορτικοστεροειδές και β2-διεγέρτη φάρμακα, έχει καίρια σημασία. Η διάρκεια της αξιολόγησης στο περιβάλλον κλινικών μελετών πρέπει να είναι τουλάχιστον εξαμηνιαία για κάθε συμμετέχοντα στο πρόγραμμα κλινικής ανάπτυξης ασθενή¹⁵. Βασικές είναι οι ακόλουθες αξιολογήσεις:

Α) Ο υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακός άξονας:

Ο προτιμώμενος τρόπος αξιολόγησης των επιπτώσεων επί του υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακού άξονος θα πρέπει να επιτελείται με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της μεταβολής της κορτιζόλης του πλάσματος 24ώρου⁹, από την αρχή της μελέτης και εύρεση των τιμών AUC και Cmax³ (και όχι με μέτρηση της κορτιζόλης των ούρων, καθώς αυτό στερείται ευαισθησίας). Η μελέτη επί ασθματικών ασθενών, θα πρέπει να γίνεται σε ελεγχόμενο περιβάλλον, με τη λήψη όλων των μέτρων που αποτρέπουν την εισαγωγή ψευδών ή λανθασμένων στοιχείων.

Β) Ο β₂-διεγέρτης και η ασφάλεια του καρδιαγγειακού συστήματος: Υπάρχει σαφής Κατευθυντήρια Οδηγία¹⁶ η οποία επιβάλλει την χρήση συσκευής Holter ρυθμού σε υποομάδα των ασθενών, καθώς και το προσδιορισμό του διαστήματος QTc σε όλο τον πληθυσμό της μελέτης.

Γ) Παράδοξος βρογχόσπασμος: Θα πρέπει να αξιολογείται προσεκτικά η τοπική ανεκτικότητα του υπό εξέταση φαρμάκου, για την πιθανότητα παράδοξου βρογχόσπασμου, που δυνητικά αποτελεί μία επικίνδυνη

για τη ζωή ανεπιθύμητη ενέργεια που στη βιβλιογραφία έχει συσχετισθεί με φάρμακα, αλλά και έκδοχα^{17,18}, και επομένως ο αποκλεισμός του είναι σημαντικός για την ασφάλεια μίας νέας φαρμακοτεχνικής μορφής ενός εισπνεομένου φαρμάκου. Η τεκμηρίωση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί στο ελεγχόμενο περιβάλλον διεξαγωγής της μελέτης, μέσω συστηματικής παρακολούθησης για τυχόν σημαντικές πτώσεις των τιμών της FEV₁, μετά την χορήγηση της δόσης.

ΕΙΔΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ

Παιδιά και έφηβοι

Σύμφωνα με την Κατευθυντήρια Οδηγία³, τα δεδομένα που αφορούν την ασφάλεια του υπό έρευνα φαρμάκου, δεν πρέπει απλά να συναχθούν καθ' υπολογισμό από τα δεδομένα επί ενηλίκων ασθματικών, αλλά θα πρέπει να αποδειχθούν είτε με μελέτες ελέγχου της ασφάλειας: μία αξιολόγηση του συστημικού αποτελέσματος των ICS επί του υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακού άξονος, και μία επί του ρυθμού αύξησης της κνήμης, μέσω κνημομέτρησης^{19,20}, ή με φαρμακοκινητική αξιολόγηση, εάν αυτή είναι εφικτή και εάν δικαιολογείται.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι δύσκολο να αποδειχθεί η θεραπευτική ισοδυναμία μεταξύ ενός ήδη εγκεκριμένου εισπνεομένου προϊόντος αναφοράς που εμπεριέχει κορτικοστεροειδές και / ή β2-διεγέρτη και όμοιου φαρμάκου με νέα φαρμακοτεχνική μορφή, διότι οι κλινικές μελέτες που χρησιμοποιούνται, συχνά λόγω σχεδιασμού, εμφανίζουν ανεπαρκή ευαισθησία μετρήσεων και συνεπώς παρουσιάζουν εγγενή αδυναμία επιβεβαίωσης του στόχου τους, δηλαδή το να αποδείξουν αδιαμφισβήτητα ότι το νέο προϊόν εμφανίζει τα ίδια ακριβώς χαρακτηριστικά ωφέλειας/κινδύνου με το εγκεκριμένο προϊόν αναφοράς. Ειδικά για ευαίσθητους πληθυσμούς ασθενών, όπως παιδιών, εφήβων και ασθενών με βαρύτερη νόσο, αυτές οι αδυναμίες δεν μπορεί να παραβλεφθούν, καθώς παρουσιάζουν σημαντικό κίνδυνο για τον ασθενή.

Οι κατευθυντήριες οδηγίες που διέπουν τα πλαίσια ελέγχου και εγκρίσεων - αδειών των φαρμάκων αυτής της κατηγορίας, είναι πλούσια και λεπτομερές. Μόνο κατά την τριετία 1995-98, εξεδόθησαν οκτώ Κατευθυντήριες Οδηγίες για το συγκεκριμένο θέμα. Όπως είναι πρόδηλο από την περιγραφή της σημερινής κατάστασης, κάθε φάκελος που υποβάλλεται για έγκριση προγράμματος

κλινικών μελετών, θα πρέπει να συμφωνεί απόλυτα με αυτές τις νέες απαιτήσεις. Και βέβαια, ο μόνος επιστημονικά αποδεκτός τρόπος, είναι η διενέργεια Κλινικών Μελετών που θα διερευνούν την Φαρμακοκινητική και την Φαρμακοδυναμική των υπό έρευνα φαρμάκων με

«ευαισθησία» στο σχεδιασμό και σαφή και ακριβή αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(βλέπε κείμενο στα Αγγλικά)

Methods for the documentation of the efficacy and safety of new formulations of inhaled drugs containing a corticosteroid and/or a β 2-agonist

Demosthenes Bouros MD, PhD, FCCP

Department of Pneumology
Medical School, Democritus University of
Thrace,
Alexandroupolis, Greece

Key words:

- inhaled combination drug;
- new formulation;
- therapeutic equivalence,
- LABA,
- ICS

SUMMARY. The approval of new formulations of orally inhaled combination products encompassing known inhaled corticosteroid (ICS), and/or long acting β 2 agonist (LABA) moieties necessitates the comprehensive assessment of current safety concerns, which may be dose- or formulation-dependent. In addition, establishing therapeutic equivalence to an already approved reference product is difficult. Clinical studies designed to gain regulatory approval, often – due to shortcomings in their design – present assay insensitivity, and thus an innate inability to confirm their aim, which is to unquestionably establish that the new product shares the same favourable risk/benefit profile as the established reference product. Especially for sensitive patient populations, such as children, adolescents and patients with more severe disease, these shortcomings cannot be overlooked, as they constitute a significant risk for the individual patient. *Pneumon 2009; 22(2):174–177*

INTRODUCTION

The clinical development and registration application by a third party to the Regulatory Authorities for a new formulation of an already approved drug, is permitted when the “protection” period of the already approved drug has expired, as defined by Trade Mark and Patents. In every case the efficacy and safety of the new formulation must be documented as being at least non inferior to the already approved drug.

In this context, the term “*bioequivalence*” was introduced officially with the Hatch-Waxman Act of the Federal Drug Agency (FDA), which determined that a “*bioequivalent drug is the drug showing absence of significant difference, regarding bioavailability of active substance at the site of the point of action of the drug*”. Bioequivalence can be ascertained on the basis of the

Correspondence:

Demosthenes Bouros MD, PhD, FCCP
Professor of Pneumology
Head, Dept of Pneumology, and
Chairman, Dept of Internal Medicine, Democritus
University of Thrace and
University Hospital of Alexandroupolis
Alexandroupolis, Greece, 68100
Tel/Fax: +30-25510-76106, Email: bouros@med.duth.gr

maximum concentration of the drug in serum, the time needed for it to reach its maximum concentration, or the "area under the curve" (AUC), based on its concentration in serum in relation with time [pharmacokinetic study]¹. Orally inhaled drugs, which act locally on the bronchii, are of particular interest in this context². In this case, the documentation of "therapeutic equivalence", which is defined as being of non-inferior efficacy and similar safety, is usually achieved by pharmacodynamic studies. In the case of inhaled drugs, containing an inhaled corticosteroid (ICS), and a long acting β_2 agonist (LABA), documentation of non-inferior efficacy, will be achieved on the basis of the assessment of pharmacodynamic parameters of pulmonary function (FEV₁, PEF)³. The documentation of therapeutic equivalence of this category of drugs becomes even more difficult when the complex pharmacodynamic behaviour of the factors involved is taken into consideration. Specifically, particles larger than 10 μm in diameter are deposited mainly in the mouth and the oropharynx; particles smaller than 2.5 μm reach the alveoli and are subsequently exhaled, without being deposited in the lungs. Only particles with a diameter of 2-6 μm will be deposited in the airways and, consequently, will be effective⁴. Unfortunately, in current clinical practice, there is no available delivery system of aerosol or dry powder producing homogeneous particles of the appropriate size⁵. Even more important, the characteristics of the emitted particles, and consequently the pattern of airway deposition and the quantity of the drug deposited, depend on the formulation, including the inhaler⁵. Beyond that, other factors, such as inhaler technique and ventilation attributes, also affect drug deposition^{6,7}. Even under ideal conditions, only a percentage of about 5% to 30% of the nominal dose of the drug is deposited in the airways⁸. The rest is swallowed. Most of the studies of ICS deposition have been performed in healthy volunteers. As most experts stress (e.g., Barnes, P.J.) "...factors like inflammatory diseases of the airways, airways obstruction, age of the patients and concomitant medication, may alter the distribution of the inhaled dose. Also, important differences may also exist, concerning the frequency and the system of administration of the drug"⁹.

From the above comments it is clear that the therapeutic equivalence of the test drug with the reference drug should be documented with appropriately designed clinical studies. The design and conduct of clinical trials of this kind demand extremely strict scientific criteria. At this particular point, concerns arise, based on the inability of most such studies to demonstrate beyond any doubt,

equivalent, or non-inferior, efficacy and safety of the test drug in comparison with the reference drug.

THE DOCUMENTATION OF EFFICACY

Pharmacokinetic Studies

As the drug which has been deposited in the airways will be absorbed into the systemic circulation, an indirect assessment of the quantity deposited in the lungs can be performed (e.g. after GI block with charcoal) through a pharmacokinetic assessment of the active substance(s) in the systemic circulation³. Potentially, this method may be used for the documentation of "equivalent efficacy", through single dose comparison, if linearity across doses can be established. The major disadvantage of this method is that it can approximate the extent of deposition, but not the pattern of deposition; it cannot determine the exact site of deposition, i.e. small or larger bronchii³. It is recognised that regional deposition depends on particle size, which in turn is formulation- and device-dependent⁸. For this reason, the pharmacokinetic approximation of the extent of deposition, but not of its pattern, cannot exclude important differences in efficacy due to formulation differences of the tested drugs¹⁰, especially amongst patients with different diseases (e.g., asthma, COPD) or different disease severity. As a result, pharmacokinetic/bioavailability studies cannot obviate the need for appropriate pharmacodynamic/clinical studies, as the recent relevant guidance suggests³. It continues to be important to explore and document with pharmacokinetic studies the linearity and proportionality between doses of the different formulations, prior to the initiation of pharmacodynamic studies. The establishment of dose proportionality will require the conduct of a pharmacokinetic study with at least two doses of the test and two of the reference drug, and data analysis on the X axis, instead of the traditional analysis on the Y axis^{3,11}. If linearity across dose-responses is demonstrated, later pharmacodynamic studies can be designed to compare only one dose, usually the higher, so as to assure dose safety and tolerability.

Pharmacodynamic Studies

A concern has been raised about the inability of most pharmacodynamic studies performed with the aim of documenting "therapeutic equivalence" between two locally acting inhaled drugs, to demonstrate beyond any doubt equal/non-inferior efficacy of the "new drug" with

the “approved reference drug”. The reason for this is simple. Any difference between the “new” and the “approved” regarding the primary variable of efficacy (e.g. FEV₁ or PEF) should be included in the pre-determined difference, which is defined by the limits of clinical significance for the difference in question. In other words, in order to accept that the two drugs do not differ in effect, the difference observed between them should be smaller than the difference/change which is clinically significant for the patient^{12,13}. In order to ascertain that the two drugs are of equal/non-inferior efficacy, the study design employed and the patient population under investigation should allow the drugs in question to exert their full effect³; otherwise, there is always a risk that two non-active or partially active drugs may be (falsely) documented to be equivalent. A critical characteristic pertaining to the design of these studies is the duration of treatment for each participating patient, which should allow the tested drugs to exert their full potential. For an ICS containing product, it is also advisable that the patient population under investigation should present sufficient room for improvement at baseline, in terms of the primary variable of efficacy; this will in turn allow for the proper assessment of equivalent or non-inferior, efficacy.

In an appropriately designed pharmacodynamic study, two conditions must be hierarchically fulfilled. Firstly, it should be demonstrated that both of the two drugs under investigation are effective. This means that when administered to the patients in the study, they produce clinically significant improvement. Secondly, it must be demonstrated that any difference observed at the end of the study between the two drugs is not clinically significant, in order to accept that the two drugs are equal regarding the full effect of their action; at the end of the study, it is not sufficient that the difference between the two drugs is included in the pre-determined limit of equivalence/non inferiority, but at the same time the improvement observed from the start (baseline) to the end of the study is larger than the difference between the two drugs observed at the end of the study (which should, by definition, be smaller than the difference/improvement that is important for the patient). Otherwise, it cannot be excluded that, although the difference between the two drugs in a particular study is included within the pre-determined limits of equivalence/non inferiority, the two drugs are not equal, and possibly one is less or more effective than the other.

For the population of patients with asthma included in such clinical trials, the above concern is frequently

the guiding rule, since these patients must receive appropriate treatment, as foreseen by current treatment guidelines. As a result these patients present small leeway for improvement during the study. Thus, the difference between the two drugs at the end of such a study is often larger than the improvement observed from baseline to end of treatment. These clinical “pharmacodynamic studies”, are characterized by design insensitivity, a well-known problem, and the clinical findings produced are inappropriate to support the “therapeutic equivalence” between the inhaled drugs under investigation, as they fail to demonstrate beyond reasonable doubt that the two drugs are indeed “similar”.

SAFETY AND TOLERABILITY

The evaluation of the systemic safety of an ICS and/or β_2 -agonist containing inhaled drug is important. The duration of the evaluation of safety within the clinical trial setting should be of at least 6 months duration per patient¹⁵. The following evaluations are deemed essential:

- a) The preferred method of assessing drug effect on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis (HPA-axis) should be performed by repeated assessment of the changes from baseline of 24 hours plasma cortisol⁹ as measured by AUC and Cmax³ (and not by means of urine cortisol excretion, which has been reported as not sufficiently sensitive). The study should be carried in a controlled environment on asthma patients, in order to ensure validity of data.
- b) The LABA component and the evaluation of cardiovascular safety: Regulatory guidance¹⁶ dictates Holter monitoring in a subgroup of patients and QTc determinations in all of the study population.
- c) Paradoxical bronchospasm: Local tolerability of the new formulation needs to be assessed for its potential for paradoxical bronchospasm; this is a potentially life-threatening adverse experience, which in the literature has been associated with both drugs and formulations/excipients^{17,18}. Monitoring for paradoxical bronchospasm can be performed by systematically monitoring for post-dose significant drops in FEV₁.

SPECIAL POPULATIONS

According to guidelines³ for children, safety data for childhood cannot be extrapolated from data generated from studies on adults with asthma, but they should be

generated either by specific pharmacodynamic tests for safety in childhood (an assessment of the systemic effects of ICSs on the HPA axis and on lower leg bone growth rate by means of knemometry^{19,20}), or a pharmacokinetic assessment, if possible and if justifiable.

CONCLUSION

The therapeutic equivalence between differing formulations of orally inhaled combination products encompassing known ICS and LABA moieties is difficult to establish. Clinical studies utilised for regulatory approval, are often – due to shortcomings in their design – characterized by assay insensitivity and thus the innate inability to confirm their aim, which is to unquestionably establish that the new product shares the favourable risk/benefit profile of the established reference product. Particularly for sensitive patient populations, such as children, adolescents and patients with more severe disease, these concerns cannot be overlooked, as they present a significant risk for the individual patient.

Regulatory guidance for this category of drugs is comprehensive and detailed. During the period 1995-1998 alone, eight guidance documents were issued. It is clear that relevant clinical programmes and registration files should comprehensively address these significant issues of drug safety and efficacy in relation to formulations of orally inhaled combination products encompassing ICS and/or LABA.

REFERENCES

1. www.emea.europa.eu: CHMP/EWP/QWP/1401/98
2. www.emea.europa.eu: CPMP/EWP/239/95
3. www.emea.europa.eu: CPMP/EWP/4151/00Rev1
4. Pritchard JN. *J Aerosol Med* 2001; 14 Suppl 1: S19-26
5. Virchow JC, Crompton GK, Dal Negro R et al. Importance of

- inhaler device in the management of airway disease. *Respir Med* 2008; 102(1): 10-19
6. Newman SP, Pavia D, Garland N, Clarke SW. *European Journal of Respiratory Diseases* 1982; 63 (Suppl 119): 57-65
7. Everard ML, Devadason SG, Le Souef PN. Flow early in the inspiratory manoeuvre affects the aerosol particle size distribution from a Turbuhaler. *Resp Medicine* 1997; 91(10): 624-628
8. Pauwels R, Newman S, Borgstrom L. Airway deposition and airway effects of antiasthma drugs delivered from metered-dose inhalers. *Eur Respir J* 1997; 10: 2127-2138
9. Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157 (3Pt2): S1-S53
10. Usman OS, Biddiscomb MF, and PJ Barnes. Regional lung deposition and broncodilator response as a function of b2-agonist particle size. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(12): 1497-1504
11. Busse WW, Brazinsky S, Jacobson K et al. Efficacy response of inhaled beclomethasone dipropionate in asthma is proportional to dose and is improved by formulation with a new propellant. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(6): 1215-1222
12. www.emea.europa.eu: CPMP/ICH/363/96
13. www.emea.europa.eu: EMEA/CPMP/EWP/2158/99
14. Barnes PJ. Efficacy of inhaled corticosteroids in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(4Pt1): 531-538
15. www.emea.europa.eu: CPMP/EWP/2922/01
16. www.emea.europa.eu: CHMP/ICH/310133/08
17. Cocchetto DM, Sykes RS, Spector S. Paradoxical bronchospasm after use of inhaler aerosols: a review of the literature. *J Asthma* 1991; 28(1): 49-53
18. Nicklas RA. Paradoxical bronchospasm associated with the use of beta-agonists. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85(5): 959-964
19. Grandman J, Wolthers OD. A randomized trial of lower leg and height growth in children with asthma treated with inhaled budesonide from a new dry powder inhaler. *Pediatr Allergy Immunol* 2009 (in press)
20. Wolthers OD. Methodology and implications of knemometry in growth assessment of inhaled glucocorticoids. *Pediatr Allergy Immunol* 2009 (in press)

Δύο περιπτώσεις βρογχο-πνευμονικών δυσπλασιών που προέρχονται από το πρόσθιο αρχέγονο έντερο

Ελευθέριος Δ. Σπάρταλης¹,
Ηλίας Λαχανάς¹,
Διονύσιος Παυλόπουλος²,
Όθωνας Π. Μιχαήλ⁴,
Άννα Καρακατσάνη³,
Περικλής Τόμος¹

¹Β' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών 'Ααϊκό'

²Θωρακοχειρουργική Κλινική, Σισμανόγλειο,

³Β' Πνευμονολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο 'Αττικό'

⁴Α' Χειρουργική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών 'Ααϊκό'

Λέξεις κλειδιά:

- Βρογχοπνευμονικό απόλυμα
- κυστική αδеноματώδης δυσπλασία
- broncho - pulmonary foregut malformations.

Αλληλογραφία:

Ε.Δ. Σπάρταλης,
Φωκίδος 42,
Τηλ. 2107488979, 6974714078,
E-mail: espartal@med.uoa.gr

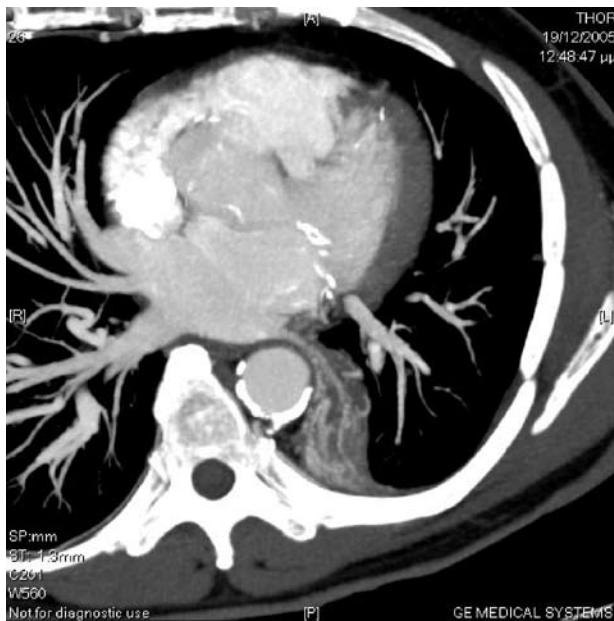
ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Οι συγγενείς βρογχοπνευμονικές δυσπλασίες είναι συνήθως ασυμπτωματικές και διαγιγνώσκονται μετά από διερεύνηση αναπνευστικών λοιμώξεων ή τυχαία μετά από απεικονιστικό έλεγχο. Για τη μελέτη των συγγενών αυτών δυσπλασιών χρησιμοποιούνται διάφορες απεικονιστικές μέθοδοι, όπως προγεννητικός υπερηχοτομογραφικός έλεγχος, απλή ακτινογραφία θώρακος, σπινθηρογράφημα αερισμού αιμάτωσης, αξονική τομογραφία, μαγνητική τομογραφία, βαριούχο γέυμα, οισοφαγοσκόπηση, βρογχοσκόπηση και ψηφιακή αγγειογραφία. Η χειρουργική εξαίρεση ήταν η θεραπεία εκλογής μας, με ιδιαίτερα ικανοποιητικό αποτέλεσμα. *Πνεύμων 2009, 22(2):178-181.*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρουσιάζονται δυο περιπτώσεις ασθενών με συγγενείς βρογχοπνευμονικές δυσπλασίες. Οι ασθενείς αυτοί προσεγγίστηκαν χειρουργικά με εκτομή των μορφωμάτων. Οι ιστολογικές εξετάσεις των χειρουργικών παρασκευασμάτων ανέδειξαν δυσπλασίες με κοινή καταβολή από το πρόσθιο αρχέγονο έντερο

ΑΝΑΦΟΡΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ

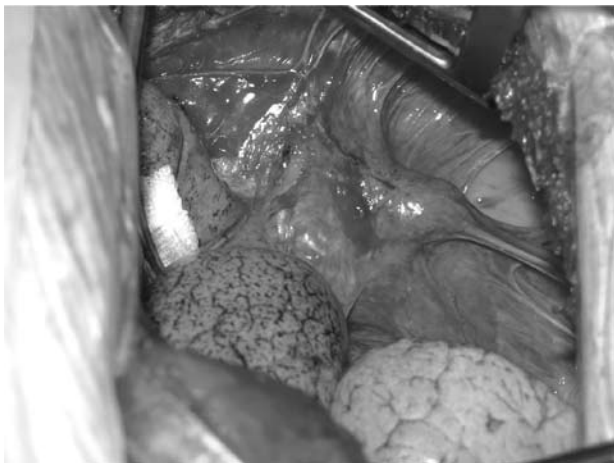
Περίπτωση 1: Ασθενής 68 ετών προσέρχεται στο νοσοκομείο μας αιτιώμενος ξηρό βήχα εδώ και 8 μήνες. Από την κλινική εξέταση δεν παρουσίαζε τίποτε το παθολογικό. Η ακτινογραφία θώρακος ανέδειξε σκίαση αριστερά παρασπονδυλικά. Από το ιστορικό του εκτός του σακχαρώδη διαβήτη για τον οποίο λάμβανε αντιδιαβητικά δισκία και την υπέρταση του η οποία αντιμετωπίζεται με αναστολέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης (αΜΕΑ). Εδώ και 8 μήνες για τον ίδιο λόγο είχε διερευνηθεί σε άλλο νοσοκομείο και είχε ήδη υποβληθεί σε αξονική τομογραφία (CT) θώρακος, η οποία διέγνωσε πυκνοατελεκτασία αριστερά παρασπονδυλικά οπότε και προτάθηκε επανάληψη της CT θώρακος μετά πάροδο 8 εβδομά-



ΕΙΚΟΝΑ 1. 3D MIP CT του απολύματος (περίπτωση 1).



ΕΙΚΟΝΑ 2. 3D MIP CT του απολύματος (περίπτωση 1).



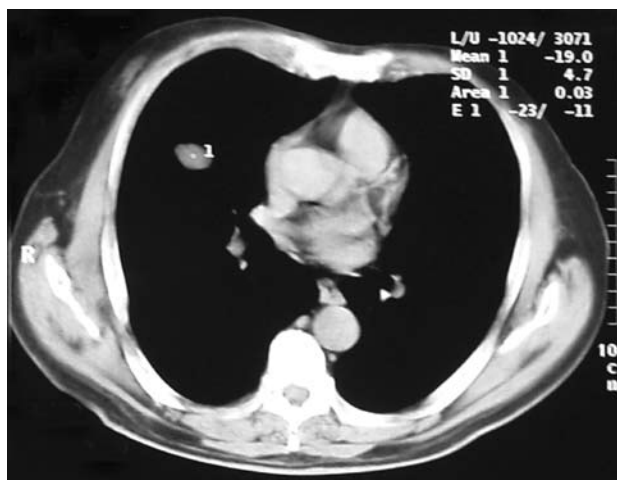
ΕΙΚΟΝΑ 3. Διεγχειρητική φωτογραφία του πνευμονικού απολύματος (περίπτωση 1).

δων. Η νέα CT δεν παρουσίαζε καμιά μεταβολή σε σχέση με την προηγούμενη και η συμπτωματολογία παρέμεινε. Στην συνέχεια επειδή τέθηκε η υπόνοια πνευμονικού απολύματος υπεβλήθη σε 3D MIP CT (maximum intensity projection) για την εντόπιση έκτοπης αιμάτωσης από την αορτή, η οποία και επιβεβαιώθηκε (Εικόνα 1 και 2). Μετά ταύτα ο ασθενής υπεβλήθη σε αριστερή θωρακοτομή και εξαίρεση του μορφώματος (Εικόνα 3) η ιστολογική εξέταση του οποίου έδειξε ότι επρόκειτο για πνευμονικό απόλυμα.



ΕΙΚΟΝΑ 4. Στην απλή ακτινογραφία θώρακος διαπιστώθηκε νομισματοειδής όζος στο δεξιό πνευμονικό πεδίο (περίπτωση 2).

Περίπτωση 2: Άνδρας ασθενής 65 ετών εισήχθει σε παθολογική κλινική για διερεύνηση νεφρικής ανεπάρκειας. Στον απεικονιστικό έλεγχο (απλή ακτινογραφία θώρακος) που πραγματοποιήθηκε διαπιστώθηκε νομισματοειδής σκίαση στο δεξιό πνεύμονα. Στην αξονική τομογραφία που ακολούθησε η βλάβη εντοπιζόταν στον μέσο λοβό του δεξιού πνεύμονα (Εικόνες 4, 5). Ακολούθησε διερευνητική



Εικόνα 5. Στην αξονική τομογραφία η βλάβη εντοπίζεται στον μέσο λοβό του δεξιού πνεύμονα (περίπτωση 2).

χειρουργική προσέγγιση με δεξιά πλάγια θωρακτομή και μέση λοβεκτομή. Από το χειρουργικό παρασκεύασμα προέκυψε κυστικό μόρφωμα (με «υγρό σαν από βράχο») για το οποίο η ιστολογική εξέταση ανέδειξε κυστική αδеноματώδη δυσπλασία (Cystic adenomatoid malformation - CCAM) με εμβρυολογική προέλευση από αρχέγονο έντερο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην τέταρτη εβδομάδα της κύησης, το πρώιμο τραχειοβρογχικό δέντρο αρχίζει να αναπτύσσεται από το πρόσθιο αρχέγονο έντερο ως εκκόλπωμα που περιβάλλεται από σπλαγχνικό μεσόδερμα. Έως τη 17^η εβδομάδα κύησης ο λαρυγγοτραχειακός σωλήνας αναπτύσσεται, ακολουθούμενος από δύο υποτυπώδεις πνεύμονες κατά την προοδευτική διακλάδωση του πνευμονικού δέντρου, διαμορφώνοντας τελικά τα τελικά βρογχιόλια υπό τη μορφή τυφλών απολήξεων. Οι τμηματικοί βρόγχοι διαμορφώνονται την 6^η εβδομάδα. Από τη 13^η εβδομάδα, τα αναπνευστικά βρογχιόλια και οι κυψελίδες αρχίζουν να διαμορφώνονται έτσι ώστε η ανταλλαγή αερίων να είναι δυνατή κατά την 24^η με 25^η εβδομάδα της κύησης. Κατά κανόνα, ο αριθμός των κυψελίδων αυξάνει στον πνεύμονα από περίπου ένα έκτο του αριθμού των ενηλικων κατά τη γέννηση για να ολοκληρωθεί μέχρι την ηλικία των 8 ετών¹.

Υπάρχουν αρκετές θεωρίες ως προς την αιτιολογία των βρογχοπνευμονικών δυσπλασιών που προέρχονται από το πρόσθιο αρχέγονο έντερο (broncho - pulmonary foregut malformations - BPFM). Παρά το γεγονός πως τα

περισσότερα μορφώματα περιγράφονται με σαφείς ιστολογικούς ορισμούς, συχνά συναντώνται πολυπλοκότερες δομές όπως είναι η κυστική αδеноματώδης δυσπλασία, το βρογχοπνευμονικό απόλυμα και το συγγενές λοβιακό εμφύσημα. Οι περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν πως αυτή η κατηγορία βλαβών έχει κοινή καταβολή ξεκινώντας από τις πρώτες εβδομάδες της ανάπτυξης των πνευμόνων. Εντούτοις, ο τύπος της δυσπλασίας και η χρονική εντόπιση της εμφάνισης της δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, ενώ διάφορες αιτίες έχουν προταθεί ως αίτια, όπως το τραύμα, η ισχαιμία, η μόλυνση και οι συμφύσεις².

Οι Clements και Warner³ προτείνουν μία ενωποιητική θεωρία που περιλαμβάνει μία κοινή αιτία για τις σημαντικότερες βρογχοπνευμονικές δυσπλασίες. Αυτό εξαρτάται από τη σχετική ανάπτυξη του πνευμονικού δέντρου ως προς την αντίστοιχη των πνευμονικών αγγείων. Οι πρώιμοι βρόγχοι αρδεύονται από τα τριχοειδή αγγεία της αρχέγονης συστηματικής κυκλοφορίας, αλλά καθώς ο πνεύμονας αναπτύσσεται αυτά τα αγγεία υποστρέφουν και επικρατεί η αγγείωση από την πνευμονική κυκλοφορία. Η διακοπή αυτής της διαδικασίας σε διαφορετικά χρονικά και τοπογραφικά σημεία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου οδηγεί σε ποικιλόμορφες δομικές και λειτουργικές ανωμαλίες της επηρεασθείσας πλευράς του πνεύμονα⁴. Η πλήρης διακοπή της πνευμονικής αρτηριακής παροχής και η διακοπή της βρογχικής ανάπτυξης θα οδηγήσουν σε αγενεσία ενός πνεύμονα, ενός λοβού ή ενός ευρύτερου τμήματος. Μια εντοπισμένη διακοπή της άρδευσης σε συνδιασμό με τη συνέχεια στην ανάπτυξη ενός περιφερικότερου τμήματος πνευμονικού ιστού, οδηγεί σε τραχειοβρογχική στένωση ή στη δημιουργία βρογχικής κύστης. Μια πρόωρη διακοπή στην ανάπτυξη του πνευμονικού αρτηριακού δικτύου θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανώμαλη ανάπτυξη του αντίστοιχου τμήματος του πνευμονικού δέντρου⁵. Το μέγεθος της βλάβης καθορίζει την ανάπτυξη του επηρεασθέντος τμήματος και η τελική αρτηριακή παροχή μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός πνευμονικού απολύματος μιας κυστικής αδενωματώδους δυσπλασίας ή μίας μικτής δυσπλασίας⁶.

Οι συγγενείς βρογχοπνευμονικές δυσπλασίες είναι συνήθως ασυμπτωματικές και διαγιγνώσκονται μετά από διερεύνηση αναπνευστικών λοιμώξεων ή τυχαία μετά από απεικονιστικό έλεγχο.

Η κυστική αδενωματώδης δυσπλασία εμφανίζεται ως μικτή συμπαγής και κυστική αμαρτωματώδης μάζα που προκύπτει από την αποτυχία του πνευμονικού παρεγχύματος να αναπτυχθεί πλήρως, και γι' αυτό περιέχει αποσυντεθιμένα στοιχεία του αναπνευστικού δέντρου

με ποικίλους κυτταρικούς τύπους. Το μόρφωμα αυτό δύναται να επικοινωνεί φυσιολογικά με το βρογχικό δέντρο και τείνει να γεμίζει με αέρα κατά την γέννηση. Μπορεί να δώσουν σημεία κατά την κύηση (ύδρωπας, πολυυδράμνιο) και να διαγνωστούν με προγεννητικό υπερηχο-γράφημα ή μετά τη γέννηση όπου ανάλογα με το μέγεθός τους μπορεί να είναι αρχικά ασυμπτωματικά ή να οδηγήσουν σε αναπνευστική δυσχέρεια έως δευτεροπαθή πνευμονική υποπλασία. Έχουν αναφερθεί επιπλοκές (μαζική αιμόπτυση, ασπεργίλλωμα, καρκίνος)

Το βρογχοπνευμονικό απόλυμα ορίζεται σαν μία μάζα πνευμονικού ιστού, η οποία δεν επικοινωνεί με τους κεντρικούς αεραγωγούς, μέσω του φυσιολογικού βρογχικού δένδρου και η οποία αιματώνεται από μη φυσιολογικό αρτηριακό κλάδο της συστηματικής κυκλοφορίας. Συνήθως είναι ασυμπτωματικό έως την εμφάνιση οξείας ή υποτροπιάζουσας πνευμονίας στην ενήλικη ζωή. Οι λοιμώξεις είναι συνήθως, μικροβιακές αν και έχουν αναφερθεί και φυματιώδεις ή μυκητιασικές. Μπορεί να ραγούν στον οισοφάγο ή την υπεζοκωτική κοιλότητα

Για τη μελέτη των συγγενών αυτών δυσπλασιών χρη-

σιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι. όπως προγεννητικός υπερηχοτομογραφικός έλεγχος, απλή ακτινογραφία θώρακος, σπινθηρογράφημα αερισμού αιμάτωσης, αξονική τομογραφία, μαγνητική τομογραφία, βαριούχο γεύμα, οισοφαγοσκόπηση, βρογχοσκόπηση και ψηφιακή αγγειογραφία. Στις δύο περιπτώσεις που αντιμετωπίσαμε στο τμήμα μας, εκτός από την απλή ακτινογραφία θώρακος, οι ασθενείς βρογχοσκοπήθηκαν, ενώ χρησιμοποιήθηκε και αξονική τομογραφία με τρισδιάστατη ανασύσταση εικόνας (3D CT scan) προσφέροντας εξαιρετική ποιότητα απεικόνισης.

Η χειρουργική εξαίρεση είναι η θεραπεία εκλογής. Η αντιμετώπιση των δικών μας περιπτώσεων περιλάμβανε εκτομή των μορφωμάτων μέσω πλάγιας θωρακοτομής την οποία επιλέξαμε για την πραγματοποίηση ασφαλέστερων ελιγμών (έναντι της θωρακοσκοπικής εκτομής) στο χειρισμό δυνητικά αγγειοβριθέστατων ανωμαλιών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(Βλέπε αγγλικό κείμενο)

Two cases of broncho-pulmonary foregut malformations

Eleftherios D. Spartalis¹,
Elias Lachanas¹,
Dionisios Pavlopoulos²,
Othonas P. Michail⁴,
Anna Karakatsani³,
Perikles Tomos¹

SUMMARY. Congenital broncho-pulmonary malformations are mostly asymptomatic. They are diagnosed during the investigation of a pulmonary infection or after a chest x-ray. Fetal ultrasound, chest x-ray, ventilation-perfusion scan, CT, MRI, barium meal, esophagoscopy, bronchoscopy and digital angiography can be used for further investigation. Surgical excision was our treatment of choice and had a significantly good prognosis. *Pneumon 2009; 22(2):182–185*

¹2nd Propedeutic Department of Surgery,
University of Athens, Medical School, "Laikon"
Hospital, Athens, Greece,

²Department of Thoracic Surgery,
"Sismanogleio" Hospital, Athens, Greece

³2nd Department of Respiratory Medicine,
University of Athens, Medical School, "Attikon"
Hospital, Athens, Greece

⁴1st Department of Surgery, University of
Athens, Medical School, "Laikon" Hospital,
Athens, Greece

Key words:

- bronchopulmonary sequestration
- cystic adenomatoid malformation
- broncho-pulmonary foregut malformations

INTRODUCTION

Two cases are reported of broncho-pulmonary foregut malformations (BPFM). The patients underwent surgery and the lesions were excised. The histological examination revealed that these were dysplastic lesions with a common origin in the embryonic foregut.

CASE REPORTS

Case 1: A 68 year-old male presented at the hospital out-patients department with an eight-month history of a dry cough. He had a history of diabetes and hypertension. Eight months earlier a chest CT scan in another medical institute demonstrated atelectasis of the left lung. Physical examination revealed nothing of significance. The chest X-ray showed a lesion in the left paravertebral space. The patient took medication (antibiotics) for 2 weeks, but the symptoms remained relatively constant. After 8 weeks a new CT scan was performed which showed no change in the lesion, and subsequent MRI suggested pulmonary embolism. The 3D MIP CT (maximum intensity projection) that followed showed ectopic perfusion of the lesion from the aorta (Figures 1 and 2). The patient underwent resection of the lesion via left posterolateral thoracotomy (Figure 3). The histological examination revealed bronchopulmonary sequestration.

Case 2: A 65 year-old male was hospitalized in the internal medicine department for renal failure. Chest X-ray revealed a right solitary pulmonary nodule. Chest CT scan demonstrated a lung lesion in the right middle lobe (Figures 4 and 5). Testing for anti-echinococcal antibodies and all tumour

Correspondence:

E.D. Spartalis, 42 Fokidos Street,
Tel. 2107488979, 6974714078,
E-mail: espartal@med.uoa.gr

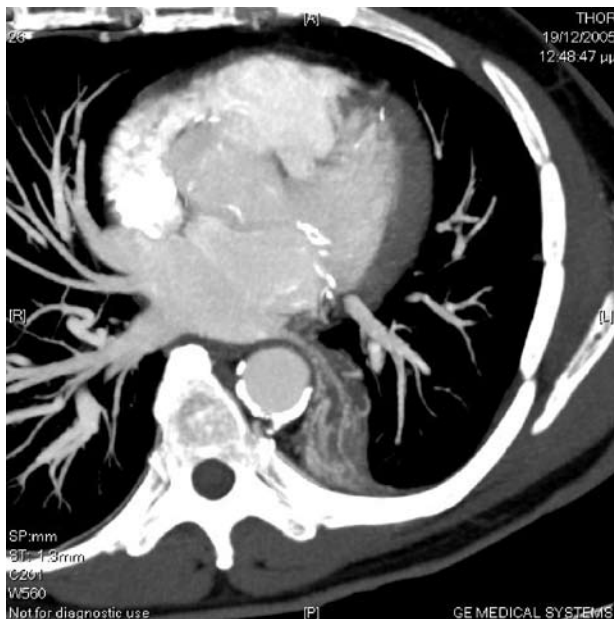


Figure 1. Case 1: 3D MIP CT of the lung sequestration.



Figure 2. Case 1: 3D MIP CT of the lung sequestration.



Figure 3. Case 1: The lesion revealed during left posterolateral thoracotomy.



Figure 4. Case 2: Chest X-ray revealing a right solitary pulmonary nodule.

markers were negative. An exploratory surgical approach was made via a right thoracotomy that resulted in a right middle lobectomy. The histological examination of the cystic lesion that was surgically excised showed a cystic adenomatoid foregut malformation.

DISCUSSION

Embryology: In order to understand the radiological

and histological appearances of this group of conditions, together with their prognosis, it is useful to review the normal development of the lung in utero. In the fourth week of gestation, the tracheobronchial bud develops from the foregut as a diverticulum surrounded by splanchnic mesoderm. From 5 to 17 weeks gestation the laryngotracheal tube develops, followed by two lung buds and progressive branching of the pulmonary tree,



Figure 5. Case2: Chest CT scan demonstrating a lesion in the right middle lobe of the lung.

eventually forming blind-ending terminal bronchioles. Segmental bronchi are formed by 6 weeks. From the 13th week, respiratory bronchioles and primitive alveoli form, so that gas exchange is possible by 24–25 weeks of gestation. From term onwards, the number of alveoli in the lung increases from approximately one sixth of the adult number to reach maturity by 8 years of age¹.

Aetiology: There are a number of theories relating to the aetiology of BPFM. Although most of the lesions can be described in discrete histological terms, mixed lesions have also been described, such as cystic adenomatoid malformation (CCAM) occurring in bronchopulmonary sequestration (BPS) and congenital lobar emphysema (CLE) with a systemic arterial supply. Most authors agree that this group of abnormalities has a common origin starting in the first weeks of lung development; however, the type and timing of the insult is less well understood, and a number of causes have been postulated including trauma, ischaemia, infection and adhesions².

Clements and Warner³ propose a unifying theory that encompasses a common cause for all the major broncho-pulmonary malformations, dependent on the relative growth and development of the pulmonary tree and pulmonary vessels. The early bronchial buds are supplied by capillaries from the primitive systemic circulation, but as the lung grows these vessels regress and the pulmonary artery supply becomes dominant. Interruption of this process at different times and sites during the development of the foetus will result in varying abnormal development in the affected area of lung⁴. Complete arrest of the pulmonary artery supply with arrest

of early bronchial development will result in agenesis of a lung, lobe or segment. A localised interruption in the blood supply, with continued distal development of lung tissue, will result in tracheal/bronchial stenosis or a bronchial cyst. An early interruption in the development of the pulmonary arterial tree could result in continued development of the primitive systemic capillary supply to a region of the lung, with resultant abnormal development of the region supplied⁵. The magnitude of the insult, therefore, would determine the exact degree of development of the affected lung tissue and the final blood supply, leading finally to BPS, CCAM, or a mixture of the two lesions⁶.

Congenital broncho-pulmonary malformations are mostly asymptomatic, and are usually diagnosed during the investigation of a pulmonary infection or on a chest X-ray taken for some other reason

CCAM presents as a mixed solid and cystic mass, apparently resulting from failure of the pulmonary mesenchyma to develop fully, and therefore containing disorganised and dilated distal components of the respiratory tract with varying cell types. The lesion can communicate normally with the bronchial tree and tends to rapidly inflate with air at birth.

BPS is classically defined as a bronchopulmonary mass separate from the normal bronchial system with an anomalous systemic arterial supply.

Fetal ultrasound, chest X-ray, ventilation-perfusion scan, CT, MRI, barium meal, oesophagoscopy, bronchoscopy and digital angiography can be used for further investigation, as indicated. The patients described here had a chest X-ray and they underwent bronchoscopy. A 3D CT scan was performed that offered excellent imaging quality. Surgical excision was the treatment of choice and had a significantly good prognosis. The approach in both these cases involved excision of the lesion via a posterolateral thoracotomy. The open procedure is safer than VATS, taking into consideration how rich the vascularity of these abnormalities usually is.

REFERENCES

1. Barnes NA, Pilling DW. Bronchopulmonary foregut malformations: embryology, radiology and quandary. *Eur Radiol* 2003; 13(12):2659-73.
2. Newman B. Congenital bronchopulmonary foregut malformations: concepts and controversies. *Pediatr Radiol* 2006; 36(8):773-91.
3. Clements BS, Warner J. Pulmonary sequestration and related congenital bronchopulmonary-vasculature malformations: nomenclature and classification based on anatomical and

embryological considerations. Thorax 1987; 42:401-408

4. Freedom RM, Yoo SJ, Goo HW Et al. The bronchopulmonary foregut malformation complex. Cardiol Young 2006; 16(3):229-51.
5. Tsugawa J, Tsugawa C, Satoh S et al. Communicating bronchopulmonary foregut malformation: particular emphasis on concomitant congenital tracheobronchial stenosis. Pediatr

Surg Int 2005; 21(11):932-5.

6. Singal AK, Kumar VR, Rao Met al. Bilateral communicating bronchopulmonary foregut malformations in a child. Ann Thorac Surg 2006; 82(1):330-2.
7. Gibson J, Geddes D, Sterk P et al. Respiratory Medicine, Saunders 3rd ed. London 2002: part D.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ
ΕΤΑΙΡΕΙΑ

ΙΑΤΡΙΚΟΣ
ΣΥΛΛΟΓΟΣ
ΛΕΣΒΟΥ

Επιστημονική Ημερίδα

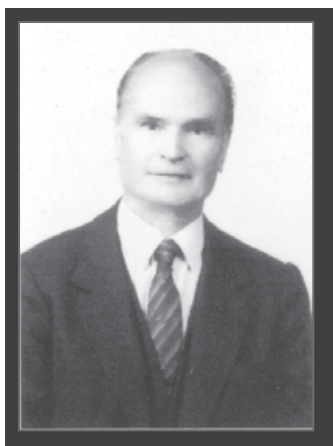
«Διαγνωστική και Θεραπευτική Προσέγγιση Νόσων του Αναπνευστικού»

20 Ιουνίου 2009

ΜΟΛΥΒΟΣ ΛΕΣΒΟΥ



Αναφορά στον Ευάγγελο Σωληναραίο Φυματιολόγο, Παθολόγο (1915-2008)



Γεννήθηκε στο Σωληνάρι Λειβαδιάς. Σπούδασε στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών από όπου και αποφοίτησε το 1940. Εργάστηκε ένα χρόνο (1941) στη Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών. Εργάστηκε δύο χρόνια (1942-1944) στην Παθολογική κλινική του Δημοτικού Νοσοκομείου «Η Ελπίς». Από το 1946 έως το 1948 εργάστηκε στο Νοσοκομείο «Σωτηρία» όπου έλαβε τον τίτλο της ειδικότητας του Φυματιολόγου. Το 1950 ονομάστηκε Διδάκτορας του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα διατριβής «Μελέτη της ενδοπνευμονικής διείσδυσης και πορείας του βρογχικού δένδρου, ανατομικώς-βρογχογραφικώς-τομογραφικώς».

Το 1951 με υποτροφία μετεκπαιδεύτηκε στο Instituto Principi Di Piemonte της Νεάπολης της Ιταλίας κοντά στον καθηγητή Monaldi όπου και ειδικεύτηκε στη διενέργεια ενδοσπληνιάδους αναρροφήσεως είτε βρογχοσκοπικά ή με εξωτερική αναρρόφηση. Εκπαιδεύτηκε επίσης στη χρήση του άκαμπτου βρογχοσκοπίου, στην έρευνα της αναπνευστικής λειτουργίας και ασχολήθηκε ιδιαίτερα με τη μελέτη των επαγγελματικών νοσημάτων των πνευμόνων.

Από το 1952-1958 εργάστηκε σαν επιμελητής στη Σωτηρία και υπεύθυνος του εργαστηρίου της Φυσιοπαθολογίας της αναπνοής, μελετώντας κυρίως τις αναπνευστικές εφεδρείες και δυνατότητες των ασθενών που επρόκειτο να χειρουργηθούν.

Το 1958 αναλαμβάνει Διευθυντής στην Β' Πνευμονολογική κλινική στο Σισμανόγλειο Νοσοκομείο και οργανώνει εργαστήριο Φυσιοπαθολογίας της αναπνοής και εργοσπιρομετρίας. Η τοποθέτησή του στο Σισμανόγλειο ταυτίζεται με την άνοδο του νοσοκομείου. Το προσωπικό του κύρος και η επιστημονική του κατάρτιση φέρνουν εκατοντάδες ασθενών με επαγγελματική έκθεση για εξέταση και νοσηλεία και το Σισμανόγλειο αποκτά ιδιαίτερο κύρος στην ιατρική κοινότητα.

Το 1958 ανακηρύσσεται Υφηγητής της Φυματιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και στη συνέχεια του απονεμήθηκε ο τίτλος του άμισθου Επίκουρου Καθηγητή. Την ίδια χρονιά του ανέθεσε το ΙΚΑ μαζί με άλλους γιατρούς την επιδημιολογική έρευνα των εργατών που έπασχαν από πνευμονοκονίωση του ορυχείου Κεράμου – Χίου. Το 1961, πάλι το ΙΚΑ του ανέθεσε την επιδημιολογική μελέτη των πασχόντων εργατών όλων των ορυχείων εκ πνευμονοκονιώσεως και των κονιορτοβριθών βιομηχανιών της χώρας.

Όταν επισκέφθηκε το Στρατώνι Χαλκιδικής έγραψε: "αναγκάστηκα να κατέβω εκατοντάδες μέτρα κάτω από τη γη, στα σκοτεινά, υγρά και ανή-

λια βάθη των στοών όπου εργάζονταν οι μεταλλωρύχοι προκειμένου να διαπιστώσω με τα ίδια μου τα μάτια στα μέτωπα διάνοιξης, προσπέλασης και παραγωγής τις ανεπίτρεπτες συνθήκες εργασίας που επικρατούσαν”.

Το 1961 επισκέφθηκε στη Βοιωτία τα ορυχεία Βωξίτου όπου και η μονάδα «Αλουμίνιον της Ελλάδας». Το 1962 του αναθέτει το ΙΚΑ τη δημιουργία εξωτερικού Ιατρείου Επαγγελματιών νόσων όπου εξετάζονται εκατοντάδες εργάτες ενώ ταυτόχρονα ανακοινώνει πνευμονοκονιώσεις που οφείλονται στη σμύριδα.

Από τις αρχές της δεκαετίας του '60 κατέβαλε ιδιαίτερες προσπάθειες να δημιουργηθεί στο Σισμανόγλειο Νοσοκομείο Κλινική Επαγγελματικών Νόσων προκειμένου στο μέλλον να μετεξελιχθεί σε Ινστιτούτο Ιατρικής της εργασίας και «φυτώριο» των ιατρών εργασίας. Για ενίσχυση της προσπάθειας του συνεργάζεται με το διεθνές γραφείο εργασίας και με Πανεπιστήμια της Ιταλίας, της Γαλλίας, της Πολωνίας και άλλων χωρών. Δυστυχώς ο στόχος αυτός δεν πραγματοποιήθηκε.

Το 1966 έλαβε το τίτλο της παθολογίας. Παράλληλα με το καθημερινό επιστημονικό του έργο έκανε εκατοντάδες ανακοινώσεις σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια για τη φυματίωση, τα επαγγελματικά νοσήματα, τον καρκίνο του πνεύμονα και επιδημιολογικές μελέτες με διεθνές ενδιαφέρον. Εξέδωσε ένα μοναδικό και ανεπανάληπτο σύγγραμμα για τα ελληνικά δεδομένα για τα επαγγελματικά νοσήματα. Στο βιβλίο αυτό πέρα από τη μοναδική επιστημονική δουλειά που έκανε με πολύ μόχθο και δυσκολία αναδεικνύονται και οι σπάνιες αρετές που τον κοσμούσαν με τον τρόπο που περιγράφει την προσέγγισή του στον άρρωστο και ταυτόχρονα μέσα από τα κείμενά του συμπάσχει. Το βιβλίο του «Επαγγελματικές πνευμονοπάθειες, επιδημιολογικά στοιχεία» αποτελείται από 885 σελίδες και περιέχει 373 ακτινολογικές εικόνες, 149 πίνακες, 236 διαγράμματα, 27 ιστογράμματα και 7 σχήματα. Στην πρώτη σελίδα του βιβλίου του ξεδιπλώνει την ψυχή του και τις κοινωνικές του ευαισθησίες. «Στη μνήμη αυτών που ζούσαν με τη δουλειά τους και δημιουργούσαν πολιτισμό, τους μεταλλωρύχους των ορυχείων Στρατωνίου-Χαλκιδικής, Κεράμου-Χίου, Λαυρίου-Αττικής, Ερμιόνης-Αργολίδος, Μήλου, Νάξου, Παγγαίου Σερρών, μύλων άλεσης ορυκτών Δραπετσώνας, τσιμεντοβιομηχανιών Αττικής και Βόλου, εκοκκιστηρίων και νηματοουργιών Λαυρίου και Βοιωτίας, χαρτοβιομηχανίας Αιγίου κ.λ.π. που θυσίασαν την υγεία τους και τη ζωή τους (όπως βλέπετε τις ακτινολογικές τους εικόνες σ' αυτό το βιβλίο), στο βωμό της εργασίας και της βιομηχανικής ανάπτυξης της χώρας, εξαιτίας της τρομερής και εγκληματικής αδιαφορίας των εργοδοτών τους (της τότε εποχής) εξαιτίας της τρομερής

και εγκληματικής αδιαφορίας των εργοδοτών τους (της τότε εποχής) για την υγεία των εργαζομένων στις επιχειρήσεις τους. Η αναφορά τους σ' αυτό το βιβλίο ας είναι ένα αιώνιο μνημόσυνο και μια έκφραση ευγνωμοσύνης για την τεράστια προσφορά τους».

Εξέτασε και νοσήλευσε πάνω από 12.500 χιλιάδες αρρώστους με όλα τα νοσήματα του θώρακα. Στο Σισμανόγλειο παρέμεινε ως Διευθυντής 25 χρόνια μέχρι το 1983 οπότε και συνταξιοδοτήθηκε.

Παρά τις οικονομικές και όχι μόνο δυσκολίες που αντιμετώπιζε τα πρώτα χρόνια της σταδιοδρομίας του έδωσε σκληρές μάχες για τη βελτίωση των όρων νοσηλείας στο Σανατώριο Σωτηρία των φυματικών. Δούλεψε σκληρά τα πρώτα μεταπολεμικά χρόνια και δεν δίστασε σε δύσκολες εποχές να συμπαραταχθεί με τους φτωχούς θεραπευόμενους για να αλλάξει η καθημερινότητα τους και ιδιαίτερα οι άποροι να αποκτήσουν ένα μικρό επίδομα. Του άρεσε πάντα να μεταλαμπαδεύει τις γνώσεις του και έτσι δεκάδες νέοι γιατροί και νοσηλευτές μυήθηκαν στα όμορφα αλλά δύσκολα μονοπάτια της πνευμονολογίας-φυματολογίας την ειδικότητα που τόσο αγάπησε και αφιέρωσε όλη του τη ζωή. Αντιμετώπισε με σθένος και παρρησία οικονομικούς, επιστημονικούς και πολιτικούς παράγοντες, ιδίως όταν άρχισε να δημοσιεύει τις εργασίες του για τις επαγγελματικές πνευμονοπάθειες. Η σκληρή δουλειά του μαζί με άλλους επιστήμονες επέσπευσε την καθιέρωση των γιατρών και μηχανικών εργασίας στους εργασιακούς χώρους. Γι' αυτές τις επιλογές του ήρθε αντιμέτωπος με την άρχουσα τάξη και την κυρίαρχη ιδεολογία. Μαζί με άλλους ερευνητές θεωρείται ένας από τους θεμελιωτές της Ιατρικής της εργασίας στην Ελλάδα. Με τις προσπάθειές του ψηφίστηκαν νόμοι, πραγματοποιήθηκαν έρευνες και δημοσιεύσεις και ήρθε στο προσκήνιο η Ιατρική της εργασίας και η επαγγελματική υγεία. Στο Ινστιτούτο Έρευνας Νοσημάτων Θώρακος (ΙΕΝΘ) όπου εργάστηκε επί δεκαετίας (1958-1967) ταυτόχρονα με το Νοσοκομείο Σισμανόγλειο παρέλασαν εκατοντάδες εργαζόμενοι ύποπτοι για επαγγελματικό νόσημα ή φυματίωση.

Από το 1963 ήταν τακτικό μέλος της επιτροπής της επιφορτισμένης με την σύνταξη νέων κανονισμών εργασίας των εργαζομένων σε όλα τα εργαστήρια και τα εργοστάσια. Θεωρείται ένας από τους ανθρώπους που έθεσαν τις βάσεις των επιδημιολογικών καταγραφών για επαγγελματικά νοσήματα στην Ελλάδα και ευαισθητοποίησε με τους αγώνες του τους αρμόδιους φορείς.

Τιμήθηκε από πολλές ιατρικές εταιρείες και πανεπιστήμια για την προσφορά του στην πνευμονολογία γενικότερα και του απονεμήθηκαν τιμητικές διακρίσεις.

Δίδαξε ιατρική τέχνη και επιστήμη αλλά κυρίως ήθος.

Επέμενε με πάθος να αγαπάμε τον συνάνθρωπό μας, να αγαπάμε τον άρρωστο. Όσοι υπήρξαν μαθητές και συνεργάτες του, όσοι τον γνώρισαν ήταν περήφανοι γι' αυτόν. Τον θεωρούσαν ένα μεγάλο δάσκαλο που πέτυχε το σκοπό του σαν άνθρωπος. Ήταν πραγματικά ένας

πνευματικός πατέρας.

Έγραψε ιστορία, άφησε παρακαταθήκη.

Για όλα αυτά τον ευχαριστούμε και θα τον θυμόμαστε πάντα.

Μάνος Ζαχαριάδης



Παρουσία του προέδρου της Σωτηρίας, ο σεβασμός απαιτούσε στάση προσοχής. Διακρίνονται οι κκ. Αθανασιάδης, Σωληναραίος και η κα Κοτσοβούλου.



Μπροστά στο Αμπέτειο, τέσσερεις νέοι φυματολόγοι (δεύτερος δεξιά ο μετέπειτα διευθυντής του Σισμανογλείου και πρωτοπόρος φυματολόγος Ε. Σωληναραίος) περιβάλλουν τον διευθυντή τους, Π. Χόρτη

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

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

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

Cover letter

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

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

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

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

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

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

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

Text. The paper should include the following sections:

Introduction

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

Methods

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

Results

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

Discussion

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

Acknowledgements

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUBMISSION:

Editor-in-Chief:

Professor Demosthenes Bouros MD, FCCP

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

152 Messogeion Ave, 11527, Athens, GREECE

Tel/Fax: +30-210-74.87.723

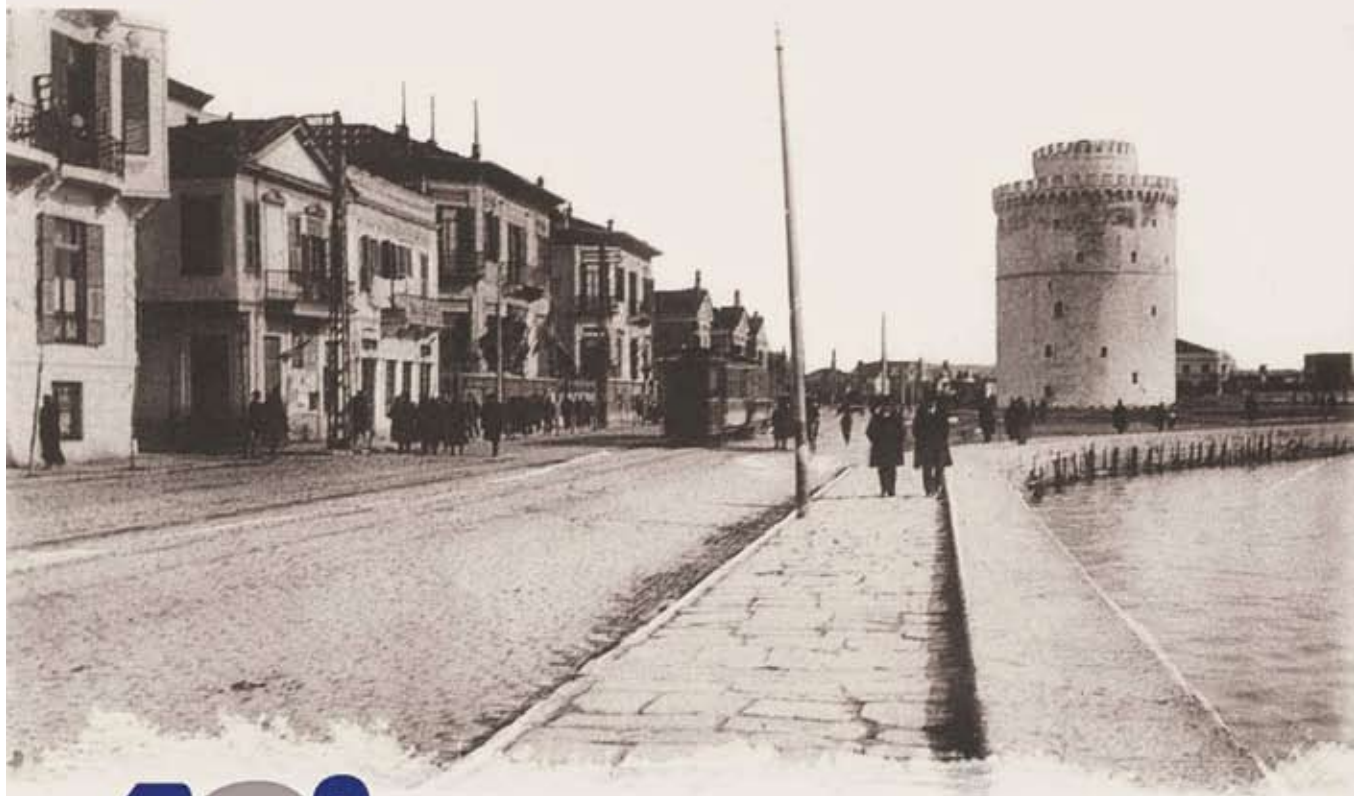
www.pneumon.org

www.hts.org.gr

e-mail: pneumon@hts.org.gr



**ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΠΑΘΕΙΩΝ
ΚΑΙ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΘΩΡΑΚΟΣ**



18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος

Θεσσαλονίκη

26-29 Νοεμβρίου 2009

MAKEDONIA PALACE

Γραμματεία:



διάσταση

Κων. Καραμανλή 24, 54639 Θεσσαλονίκη • Τηλ. 2310/889244-45, Fax 2310/889246
E-mail: diastasi@diastasitravel.gr • Website: www.diastasitravel.com

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ. 1. ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ Alvesso 160 μικρογραμμαρία, διάλυμα για εισπνοή υπό πίεση. **2. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ.** Ένας ψεκασμός (δόση που αποδίδεται από το ακροφύσιο) περιέχει 160 μικρογραμμαρία ciclesonide. Για τα έκδοχα, βλέπε λήμμα 6.1. **3. ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΗ ΜΟΡΦΗ** Διάλυμα για εισπνοή υπό πίεση. Διαυγές και άχρωμο. **4. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ. 4.1 Θεραπευτικές ενδείξεις** Θεραπεία για τον έλεγχο του επίμονου άσθματος σε ενήλικες και εφήβους (12 ετών και άνω). **4.2 Δοσολογία και τρόπος χορήγησης** Το φαρμακευτικό προϊόν προορίζεται για χρήση δια εισπνοών μόνο. Συνιστώμενη δοσολογία για ενήλικες και εφήβους: Η συνιστώμενη δόση Alvesso είναι 160 μικρογραμμαρία δύο φορές ημερησίως, η οποία οδηγεί σε έλεγχο του άσθματος στην πλειονότητα των ασθενών. Όμως, σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα, μελέτη 12 εβδομάδων έχει δείξει ότι δόση 640 μικρογραμμαρίων/ημέρα (χορηγούμενη ως 320 μικρογραμμαρία δύο φορές ημερησίως) οδηγούσε σε μείωση της συχνότητας των παροξυσμών αλλά χωρίς βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας (βλ. παράγραφο 5.1.). Η μείωση της δόσης στα 80 μικρογραμμαρία από τις ημερησίως μπορεί να είναι η αποτελεσματική δόση συντήρησης για αριστεμένους ασθενείς. Το Alvesso πρέπει κατά προτίμηση να χορηγείται το βράδυ, ανά και η πρωινή χορήγηση της δόσης του Alvesso έχει επίσης αποδειχθεί αποτελεσματική. Η τελική απόφαση ως προς τη βραδινή ή πρωινή χορήγηση της δόσης αφήνεται στην κρίση του θεράποντος ιατρού. Με τη χορήγηση του Alvesso τα συμπτώματα αρχίζουν να βελτιώνονται εντός 24 ωρών. Αφού επιτευχθεί ο έλεγχος, η δόση του Alvesso πρέπει να εξατομικεύεται και να ρυθμίζεται στην ελάχιστη δόση που χρειάζεται για τη διατήρηση του αποτελεσματικού ελέγχου του άσθματος. Οι ασθενείς με σοβαρό άσθμα κινδυνεύουν από εξάρσεις και πρέπει να υποβάλλονται σε τακτικές εκτιμήσεις του ελέγχου του άσθματος, συμπεριλαμβανομένων των δοκιμασιών της αναπνευστικής λειτουργίας. Η αυξημένη χρήση βρογχοδιασταλτικών βραχείας δράσης για την ανακούφιση των συμπτωμάτων του άσθματος δείχνει επιδείνωση του ελέγχου του άσθματος. Εάν οι ασθενείς παρατηρήσουν ότι η ανακούφιση από τη χρήση βραχείας δράσης βρογχοδιασταλτικών είναι λιγότερο αποτελεσματική ή χρειάζονται περισσότερες εισπνοές από 6,1 συνήθως, πρέπει να ήττησουν ιατρική εξέταση. Σε αυτή την περίπτωση, οι ασθενείς πρέπει να επανεκτιμηθούν και πρέπει να ληφθεί υπόψη η ανάγκη για αυξημένη αντιεπιχειρησιακή θεραπευτική αγωγή (π.χ. μια υψηλότερη δόση Alvesso για βραχεία περίοδο [βλ. παράγραφο 5.1.] ή 4 έως κύκλος χορήγησης από του στόματος κορτικοστεροειδών). Οι σοβαρές εξάρσεις του άσθματος πρέπει να αντιμετωπίζονται με το συνήθη τρόπο. Για να αντιμετωπιστούν οι ειδικές ανάγκες των ασθενών, όπως η δυσκολία στην ταυτόχρονη πίεση της δοσιμετρικής συσκευής με την εισπνοή, το Alvesso μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη συσκευή αεροθαλάμιο AeroChamber Plus. **Ειδικές ομάδες ασθενών.** Δε χρειάζεται ρύθμιση της δοσολογίας σε ηλικιωμένους ασθενείς ή σε ασθενείς με διαταραγμένη ηπατική ή νεφρική λειτουργία. Προς το παρόν, δεν υπάρχουν επαρκή διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τη θεραπεία παιδιών 12 ετών και κάτω με το Alvesso. **Οδηγίες χρήσης και χειρισμού:** Πρέπει να χορηγούνται στον ασθενή οδηγίες χρήσης της δοσιμετρικής συσκευής εισπνοών. Εάν η δοσιμετρική συσκευή είναι καινούργια ή αν δεν έχει χρησιμοποιηθεί για περισσότερο από μία εβδομάδα, πρέπει να αποκαθαριστεί τρεις ψεκασμούς στον αέρα. Δεν απαιτείται ανακίνηση της συσκευής αφού προκύψει για διάλυμα αερολύματος. Κατά τη διάρκεια της εισπνοής ο ασθενής πρέπει να είναι κατά προτίμηση καθιστός ή όρθιος και η δοσιμετρική συσκευή πρέπει να κρατείται κάθετα με τον αντίχειρα τοποθετημένη στη βάση της, κάτω από το ακροφύσιο. Συμβούλεται τον ασθενή να αφαιρείσει το κάλυμμα του ακροφυσίου, να τοποθετήσει τη δοσιμετρική συσκευή στο στόμα του, να κλείσει τα χείλη γύρω από το ακροφύσιο και να εισπνεύσει αργά και βαθιά. Κατά τη διάρκεια της εισπνοής από το στόμα, πρέπει να πιέσει το πάνω μέρος της δοσιμετρικής συσκευής προς τα κάτω. Στη συνέχεια, ο ασθενής πρέπει να αφαιρείσει τη δοσιμετρική συσκευή από το στόμα και να κρατήσει την αναπνοή του για περίπου 10 δευτερόλεπτα ή όσο αισθάνεται άνετα. Ο ασθενής δεν πρέπει να εκπνεύσει μέσα στη δοσιμετρική συσκευή. Τέλος, ο ασθενής πρέπει να εκπνεύσει αργά και να επανατοποθετήσει το κάλυμμα του ακροφυσίου στη θέση του. Το ακροφύσιο πρέπει να καθαρίζεται με ένα στεγνό χαρτοπόνητο ή ύφασμα μια φορά την εβδομάδα. Η δοσιμετρική συσκευή δεν πρέπει να πλένεται ή να τοποθετείται στο νερό. Για λεπτομερείς οδηγίες, βλ. Φύλλο Οδηγιών Χρήσης. **4.3 Αντενδείξεις** Υπερчувствισμός στη ciclesonide ή σε κάποιο από τα έκδοχα. **4.4 Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις κατά τη χρήση** Όπως με όλα τα εισπνεύσιμα κορτικοστεροειδή, το Alvesso πρέπει να χορηγείται με προσοχή σε ασθενείς με ενεργή ή λανθάνουσα πνευμονική μυσητίαση, μυκητιασικές, ιογενείς ή βακτηριακές λοιμώξεις και μόνο στην περίπτωση που οι ασθενείς αυτό θεραπεύονται επαρκώς. Όπως με όλα τα εισπνεύσιμα κορτικοστεροειδή, το Alvesso δεν ενδείκνυται στη θεραπευτική αγωγή του status asthmaticus ή άλλων οξέων επεισοδίων άσθματος όπου απαιτείται η χρήση εντατικών μέτρων. Όπως με όλα τα εισπνεύσιμα κορτικοστεροειδή, το Alvesso δεν προορίζεται για την ανακούφιση των οξέων συμπτωμάτων άσθματος για τα οποία απαιτείται η χορήγηση εισπνεύσιμων βρογχοδιασταλτικών βραχείας δράσης. Πρέπει να συνιστάται στους ασθενείς να έχουν τέτοιου είδους φαρμακευτική αγωγή διάσωσης διαθέσιμη. Πιθανό να παρουσιαστούν συστηματικές επιδράσεις των εισπνεύσιμων κορτικοστεροειδών, ιδιαίτερα όταν συνταγογραφούνται υψηλές δόσεις για παρατεταμένες χρονικές περιόδους. Αυτές οι επιδράσεις είναι πολύ λιγότερο πιθανές να συμβούν σε σύγκριση με από του στόματος χορηγούμενα κορτικοστεροειδή. Πιθανές συστηματικές επιδράσεις περιλαμβάνουν επινεφροειδική καταστολή, καθυστέρηση της ανάπτυξης στα παιδιά και στους εφήβους, μείωση της οστικής πυκνότητας, καταρράκτη και γλαύκωμα. Συνεπώς, είναι σημαντικό να ρυθμίζεται η δόση του εισπνεύσιμου κορτικοστεροειδούς στη χαμηλότερη δόση με την οποία διατηρείται αποτελεσματικός έλεγχος του άσθματος. Συνιστάται ο τακτικός έλεγχος του ύψους των παιδιών και των εφήβων που λαμβάνουν θεραπεία με κορτικοστεροειδή. Σε περίπτωση καθυστέρησης της ανάπτυξης, η θεραπεία πρέπει να επανεξεταστεί με σκοπό την μείωση της δοσολογίας του εισπνεύσιμου κορτικοστεροειδούς στη χαμηλότερη δόση που εξασφαλίζει αποτελεσματικό έλεγχο του άσθματος. Επίσης, πρέπει να αξιολογείται εάν ο ασθενής πρέπει να απευθυνθεί σε παιδίατρο εξειδικευμένο με νόσους του αναπνευστικού. Δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για ασθενείς με σοβαρή διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας. Αναμένεται αυξημένη έκθεση των ασθενών με σοβαρή διαταραχή της ηπατικής λειτουργίας. Για το λόγο αυτό οι ασθενείς αυτό πρέπει να παρακολουθούνται για πιθανές συστηματικές επιδράσεις. Τα οφέλη της εισπνεύσιμης ciclesonide πρέπει να εξαλογιστούν την ανάγκη για χρήση από του στόματος κορτικοστεροειδών στεροειδών. Ωστόσο, οι ασθενείς οι οποίοι αλλάζουν θεραπεία από στεροειδή χορηγούμενα από το στόμα, εξακολουθούν να διατρέχουν τον κίνδυνο μειωμένης επινεφροειδικής εφεδρείας για σημαντικό χρονικό διάστημα μετά από την αλλαγή της θεραπείας τους σε εισπνεύσιμη ciclesonide. Η πιθανότητα εμφάνισης αντίστοιχων συμπτωμάτων μπορεί να επιμένει για αρκετό χρόνο. Σε αυτούς τους ασθενείς μπορεί να χρειαστούν εξειδικευμένες συμβουλές για τον καθορισμό της έκτασης της διαταραχής της επινεφροειδικής λειτουργίας πριν από οποιοδήποτε προγραμματισμένες επεμβάσεις. Πρέπει πάντοτε να λαμβάνεται υπόψη σε έκτακτες περιπτώσεις (ιατρικές ή χειρουργικές) και σε συγκεκριμένες διαδικασίες που είναι πιθανό να προκαλέσουν stress, η πιθανότητα υπολειπόμενης, μειωμένης επινεφροειδικής απόκρισης, και να εξεταστεί το ενδεχόμενο χορήγησης κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής με κορτικοστεροειδή. Για την αλλαγή της θεραπείας ασθενών οι οποίοι βρίσκονται σε θεραπευτική αγωγή ή με από του στόματος χορηγούμενα κορτικοστεροειδή: Η αλλαγή της θεραπείας των ασθενών που λαμβάνουν από του στόματος στεροειδή σε θεραπεία με εισπνεύσιμη ciclesonide και η ακολουθία αντιμετώπιση τους, απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή καθότι η απελευθέρωση της μειωμένης φαιοσφαινεργικής λειτουργίας, που οφείλεται σε παρατεταμένη συστηματική θεραπεία με στεροειδή, μπορεί να χρειαστεί αρκετό χρονικό διάστημα. Ασθενείς οι οποίοι έχουν λάβει θεραπεία με συστηματικά χορηγούμενα στεροειδή για μακρές χρονικές περιόδους ή σε υψηλές δόσεις, πιθανόν να παρουσιάζουν φαιοσφαινεργική καταστολή. Σε αυτούς τους ασθενείς πρέπει να παρακολουθείται τακτικά η φαιοσφαινεργική λειτουργία και να μειώνεται προοδευτικά η δόση των συστηματικά χορηγούμενων στεροειδών. Μετά από περίπου μία εβδομάδα, ξεκινά ο σταδιακή διακοπή του συστηματικά χορηγούμενων στεροειδών με μείωση της δόσης της προενζυμολόγησης ή υποδόνησης ποσότητας κατά 1 mg ανά εβδομάδα. Για δόσεις συντήρησης προενζυμολόγηση που υπερβαίνουν τα 10 mg ημερησίως μπορεί να είναι κατάλληλο να γίνουν με προσοχή μεγαλύτερες δοσολογικές μειώσεις ανά εβδομάδα χρονικά διαστήματα. Ορισμένοι ασθενείς αισθάνονται άγχος κατά μη συγκεκριμένο τρόπο κατά τη διάρκεια της φάσης διακοπής της θεραπείας, παρά τη διατήρηση ή ακόμα και τη βελτίωση της αναπνευστικής τους λειτουργίας. Θα πρέπει να ενθαρρυνθούν να επιμεινούν στη θεραπεία με την εισπνεύσιμη ciclesonide και να συνεχίσουν τη διακοπή του συστηματικά χορηγούμενων στεροειδών, εκτός εάν υπάρχουν αντικειμενικά σημεία επινεφροειδικής ανεπάρκειας. Ασθενείς οι οποίοι αλλάζουν θεραπεία από στεροειδή χορηγούμενα από του στόματος και των οποίων η φαιοσφαινεργική λειτουργία εξακολουθεί να είναι μειωμένη, πρέπει να φέρουν προειδοποιητική κάρτα που να υποδεικνύει ότι χρειάζονται επιπρόσθετη θεραπεία με συστηματική χορήγηση στεροειδών κατά τη διάρκεια περιόδων stress, π.χ. επιδείνωση των οσθητικών κρίσεων, λοιμώξεις, ψώρα, μείζονας παρεμβαλλόμενης νόσου, χειρουργική επέμβαση, τραύματα κ.λπ. Η αντικατάσταση της θεραπευτικής αγωγής του συστηματικά χορηγούμενων στεροειδών από θεραπεία με εισπνοές μερικές φορές αποκαλύπτει αλλεργίες, όπως είναι η αλλεργική ρινίτις ή το έκζεμα, που ελέγχονται προηγουμένως με τη συστηματική χορήγηση φαρμάκου. Ο παράδοξος βρογχοσπασμός με άμεση αύξηση του συμγυμίου ή άλλα συμπτώματα βρογχοσπασμώδους κακίου χορήγησης της δόσης πρέπει να αντιμετωπίζονται με τη χορήγηση εισπνεύσιμων βραχείας δράσης βρογχοδιασταλτικών, που συνήθως οδηγεί σε ταχεία αναμείωσή των συμπτωμάτων. Ο ασθενής θα πρέπει να αξιολογείται και η θεραπεία με το Alvesso θα πρέπει να συνεχιστεί μόνο εάν κατόπιν προεπικτικής μελέτης, τα αναμενόμενα οφέλη υπερτερούν του πιθανού κινδύνου. Ο συστηματικός ανήσυχος στην βαρύτητα του άσθματος και στη γενική ευαισθησία όσον αφορά τις εξείσεις βρογχικές αντιδράσεις θα πρέπει να ληφθεί υπόψη (βλ. λήμμα 4.8). Η τεχνική που εφαρμόζουν οι ασθενείς με τη δοσιμετρική συσκευή πρέπει να ελεγχεται τακτικά, με σκοπό να διασφαλιστεί ότι η ενεργοποίηση της δοσιμετρικής συσκευής συγχρονίζεται με την εισπνοή, εξαφορισώντας με αυτό τον τρόπο τη βέλτιστη απόδοση του φαρμάκου στους πνεύμονες. Η ταυτόχρονη θεραπεία με τεκτονολόγηση ή άλλους ισχυρούς αναστολείς CYP3A4 πρέπει να αποφευχθεί εκτός εάν το όφελος υπερβαίνει τον αυξημένο κίνδυνο συστηματικών ανεπιθύμητων ενεργειών των κορτικοστεροειδών (βλέπε παράγραφο 4.5). **4.5 Αλληλεπιδράσεις με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες μορφές αλληλεπιδράσεων** Αν in vitro δεδομένα προκύπτει ότι το CYP3A4 είναι το κύριο ένζυμο που εμπλεκέται στο μεταβολισμό του ενεργού μεταβολίτη M1 της ciclesonide στον άνθρωπο. Σε μια μελέτη αλληλεπιδράσεων φαρμάκου-φαρμάκου σε ασθενείς χορηγούμενη ciclesonide και τεκτονολόγηση ως ισχυρό αναστολέα του CYP3A4, η επίδραση στο δρομικό μεταβολίτη M1 αυξήθηκε κατά 3,5 φορές, ενώ η έκθεση στην ciclesonide δεν επηρεάστηκε. Συνεπώς, η ταυτόχρονη χορήγηση ισχυρών αναστολέων του CYP3A4 (π.χ. τεκτονολόγηση, τεκτονολόγηση ή τεκτονολόγηση) πρέπει να αποφευχθεί εκτός εάν το όφελος υπερβαίνει τον αυξημένο κίνδυνο συστηματικών ανεπιθύμητων ενεργειών των κορτικοστεροειδών. **4.6 Κύηση και γαλουχία** Δεν υπάρχουν επαρκείς και καλά ελεγχόμενες μελέτες σε εγκύους γυναίκες. Σε μελέτες σε ζώα τα γλυκοκορτικοειδή έδειξαν ότι επάγουν τις διαμνητικές διαταραχές (βλέπε λήμμα 5.3). Αυτό δεν είναι πιθανό να σχετίζεται με ανθρώπους που λαμβάνουν τις συνιστώμενες εισπνεύσιμες δόσεις. Όπως με άλλα γλυκοκορτικοειδή, η ciclesonide πρέπει να χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της κύησης μόνο εάν το πιθανό όφελος για τη μητέρα δικαιολογεί το δυνητικό κίνδυνο για το έμβρυο. Πρέπει να χρησιμοποιείται η ελάχιστη αποτελεσματική δόση ciclesonide που απαιτείται για τη διατήρηση του ελέγχου του άσθματος. Τα βρέφη που γεννιούνται από μητέρες που έλαβαν κορτικοστεροειδή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης πρέπει να παρακολουθούνται προσεκτικά για υπολειποθυρία του φαιού των επινεφριδίων. Είναι άγνωστο εάν η ciclesonide εκκρίνεται στο ανθρώπινο μητρικό γάλα. Θα πρέπει να εξεταστεί η χορήγηση ciclesonide σε γυναίκες που θηλάζουν μόνο εάν το αναμενόμενο όφελος για τη μητέρα είναι μεγαλύτερο από κάθε πιθανό κίνδυνο για το παιδί. **4.7 Επιδράσεις στην ικανότητα οδήγησης και χειρισμού μηχανών** Η εισπνεύσιμη ciclesonide δεν έχει καμία ή ελάχιστη αμελητέα επίδραση στην ικανότητα οδήγησης και χειρισμού μηχανών. **4.8 Ανεπιθύμητες ενέργειες** Περίπου 4% των ασθενών εκδήλωσαν ανεπιθύμητες ενέργειες σε κλινικές μελέτες με το Alvesso, το οποίο χορηγούνταν σε ημερησικές δόσεις με εύρος από 40 έως 1280 μικρογραμμαρία. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, αυτές ήταν ήπιες και δεν απαιτήθηκε διακοπή της θεραπείας με το Alvesso. Ο παράδοξος βρογχοσπασμός μπορεί να εμφανιστεί αμέσως μετά τη χορήγηση της δόσης και είναι μια μη-συγκεκριμένη οξεία αντίδραση σε όλα τα εισπνεύσιμα φαρμακευτικά προϊόντα, η οποία μπορεί να σχετίζεται με τη δραστική ουσία, το έκδοχο ή την ψεύη κατά την εξόληση στην περίπτωση δοσιμετρικών συσκευών εισπνοών. Σε σοβαρές περιπτώσεις θα πρέπει να εξεταστεί η διακοπή

Οργανικό σύστημα	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	Οχι συχνές (>1/1000, <1/100)	Πολύ σπάνιες (<1/10.000, συμπεριλαμβανομένων μεμονωμένων αναφορών)
Διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος	Άσχημη γεύση		
Γενικές διαταραχές και καταστάσεις της οδού χορήγησης	Αντιδράσεις της θέσης εφαρμογής όπως αίσθημα καύσου, φλεγμονή και ερεθισμός. Ξηρότητα της θέσης εφαρμογής		
Διαταραχές του αναπνευστικού συστήματος, του θώρακα και του μεσοθωρακίου	Βράγχος φωνής, Ξηράς μετά από εισπνοή. Παράδοξος βρογχοσπασμός		
Διαταραχές του δέρματος και του υποδόριου ιστού	Εξάνθημα και έκζεμα		
Διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος			Άμεσες ή ύψιμες αντιδράσεις υπερευαισθησίας όπως αγγειοοίδημα με οίδημα των χελιών, της γλώσσας και του φάρυγγα

του Alvesso. Μπορεί να παρουσιαστούν συστηματικές επιδράσεις των εισπνεύσιμων κορτικοστεροειδών, ιδιαίτερα όταν χορηγούνται σε υψηλές δόσεις για παρατεταμένες χρονικές περιόδους. Πιθανές συστηματικές επιδράσεις περιλαμβάνουν σύνδρομο Cushing, σύνδρομο ομοιάζον με Cushing, καταστολή επινεφριδίων, καθυστέρηση της ανάπτυξης στα παιδιά και εφήβους, μείωση οστικής πυκνότητας, καταρράκτη, γλαύκωμα (βλ. επίσης λήμμα 4.4). **4.5 Υπερδοσολογία** Οξεία: Η εισπνοή από υγείες ελλείψεις μιας εφάπαξ δόσης 2880 μικρογραμμαρίων ciclesonide ήταν καλά ανεκτή. Η πιθανότητα εμφάνισης οξέων τοξικών επιδράσεων που ακολουθούν την υπερδοσολογία με εισπνεύσιμη ciclesonide είναι χαμηλή. Κατόπιν οξείας υπερδοσολογίας δεν απαιτείται συγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή. Χρόνια: Κατόπιν παρατεταμένης χορήγησης 1280 μικρογραμμαρίων ciclesonide, δεν παρατηρήθηκαν κλινικά σημεία επινεφροειδικής καταστολής. Ωστόσο, αν συνεχιστεί η χορήγηση δόσης υψηλότερης της συνιστώμενης για παρατεταμένες χρονικές περιόδους, δεν μπορεί να αποκλειστεί κάποιος βαθμός επινεφροειδικής καταστολής. Μπορεί να απαιτηθεί παρακολούθηση της επινεφροειδικής εφεδρείας. **5. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ. 5.1 Φαρμακοδυναμικές ιδιότητες** Φαρμακοδυναμική κατηγορία: Άλλα φάρμακα για τις αποφρακτικές παθήσεις των αεραφόρων οδών, εισπνεύσιμα, γλυκοκορτικοειδή. Κωδικός ATC: R03B A08. Η ciclesonide παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια δέσμευσης με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Μετά από του στόματος εισπνοή, η ciclesonide μετατρέπεται ενζυμικά στους πνεύμονες, στον κύριο μεταβολίτη (C21-de-methylprogesterone-ciclesonide) ο οποίος έχει έκδηλη αντιεπιχειρησιακή δράση και για το λόγο αυτό θεωρείται ο ενεργός μεταβολίτης. Σε τέσσερις κλινικές δοκιμές, έχει δείξει ότι η ciclesonide μειώνει την υπεραντιεπιχειρησιακή των αεραφόρων οδών στη μονοφασμική αδενοσύνθεση στους υπεραντιεπιχειρησιακούς ασθενείς, με το μέγιστο αποτέλεσμα να παρατηρείται με τη δόση των 640 μικρογραμμαρίων. Σε άλλη δοκιμή, η προθεραπεία με ciclesonide για επτά ημέρες μετρίσε σημαντικά τις αντιδράσεις πρώιμης και ύψιμης φάσης που προκλήθηκαν μετά από εισπνοή αλλεργιογόνου. Η αγωγή με εισπνεύσιμη ciclesonide αποδείχθηκε επίσης ότι μετράει την αύξηση των φλεγμονωδών κυττάρων (σύνολο ηωσινοφίλων) και των φλεγμονωδών διαμεσοφαιδίων σε σταγόνες πτερίδας. Ελεγχόμενη μελέτη συνέναντας την AUC της κορτιζόλης 24ώρου στο πλάσμα σε 26 ενήλικους ασθματικούς ασθενείς μετά από αγωγή 7 ημερών. Σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, η αγωγή με 320, 640 και 1280 μικρογραμμαρία ciclesonide ανά ημέρα, δεν μείωσε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό τις μέσες τιμές της κορτιζόλης 24ώρου στο πλάσμα (AUC(0-24)/24 ώρες) ούτε οξείες κάποιες δοσοεξαρτημένες επιδράσεις. Σε κλινική δοκιμή στην οποία συμμετείχαν 164 ενήλικες άνδρες και γυναίκες ελαφρώς άσθματικοί, χορηγήθηκαν ciclesonide σε δόσεις 320 μικρογραμμαρίων ή 640 μικρογραμμαρίων/ημέρα για χρονικό διάστημα 12 εβδομάδων. Κατόπιν διέγερσης με 1 και 250 μικρογραμμαρία corynorphin, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο. Διπλά-τύφλες, ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο δοκιμές διάρκειας 12 εβδομάδων σε ενήλικες και εφήβους έχουν δείξει ότι η αγωγή με ciclesonide, είχε ως αποτέλεσμα βελτιωμένη πνευμονική λειτουργία, μετρούμενη με τον FEV1 και τη μέγιστη εκπνευστική ροή, βελτιωμένο έλεγχο των συμπτωμάτων του άσθματος και μειωμένη ανάγκη για εισπνεύσιμους βήτα-2 αγωνιστές. Σε μελέτη διάρκειας 12 εβδομάδων με 680 ασθενείς με σοβαρό άσθμα, οι οποίοι προηγουμένως είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με 500 - 1000 μικρογραμμαρία προπριονικής φλουτικασόνης ανά ημέρα ή με ισοδόνη, ποσοστό 87,3% και 93,3% των ασθενών δεν εκδήλωσε παρόξυσμα κατά τη διάρκεια της θεραπείας με 160 ή 640 μικρογραμμαρία ciclesonide, αντίστοιχα. Στο τέλος της περιόδου μελέτης των 12 εβδομάδων, τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δόσεων 160 μικρογραμμαρίων και 640 μικρογραμμαρίων ciclesonide ανά ημέρα, αναφορικά με την εμφάνιση παρόξυσμων μετά την πρώτη ημέρα της μελέτης: 43 ασθενείς/339 (= 12,7%) στην ομάδα των 160 μικρογραμμαρίων/ημέρα και 23 ασθενείς/341 (= 6,7%) στην ομάδα των 640 μικρογραμμαρίων/ημέρα (λόγος κινδύνου = 0,526, p = 0,0134). Και οι δύο δόσεις ciclesonide οδήγησαν σε συγκρίσιμες τιμές FEV1 στις 12 εβδομάδες. Αντιεπιχειρησιακά σχετιζόμενα με τη θεραπεία παρατηρήθηκαν στο 3,8% και 5% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 160 ή 640 μικρογραμμαρία ciclesonide ανά ημέρα, αντίστοιχα. Δεν έγινε μελέτη για σύγκριση των ημερησίων δόσεων 160 μικρογραμμαρίων, 320 μικρογραμμαρίων και 640 μικρογραμμαρίων σε ασθενείς με σοβαρό άσθμα. **5.2 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες** Η ciclesonide παρουσιάζεται ως διάλυμα αερολύματος, που αποτελείται από πρωσιμικό υλικό HFA-134a και αιθανόλη, το οποίο επιδεικνύει γραμμική σχέση ανάμεσα στις διαφόρες δόσεις, περιεκτικότητες εισπνοών και τη συστηματική έκθεση. ΑΠΟΡΡΟΦΗ: Μελέτες με από του στόματος και ενδοφλέβιους χορηγούμενους ραδιοσηματομενισμένη ciclesonide έχουν δείξει ατελή έκταση της από του στόματος απορρόφησης (24,5%). Η από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα της ciclesonide και του ενεργού μεταβολίτη της είναι αμελητέα (<0,5% για την ciclesonide, <1% για το μεταβολίτη). Με βάση ένα πείραμα γ-σπινθηρογραφίας, η εναπόθεση στους πνεύμονες σε υγιή άτομα είναι 52%. Σε άμεση σχέση με αυτή την τιμή, η συστηματική βιοδιαθεσιμότητα του ενεργού μεταβολίτη είναι >50% χορηγούμενη δόση της δοσιμετρικής συσκευής εισπνοών της ciclesonide. Καθώς η από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα του ενεργού μεταβολίτη είναι <1%, η ποσότητα της εισπνεύσιμης ciclesonide που καταπνέεται, δε συμβάλλει στη συστηματική απορρόφηση. ΚΑΤΑΝΟΜΗ: Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε υγιή άτομα, η αρχική φάση κατανομής της ciclesonide ήταν ταχεία και σε συμφωνία με την υψηλή λιποφιλία που παρουσιάζει. Ο όγκος κατανομής ήταν κατά μέσο όρο 2,9 l/kg. Η συνολική κάθαρση ορού της ciclesonide είναι υψηλή (κατά μέσο όρο 2,0 l/h/kg) υποδεικνύοντας υψηλή ηπατική απέκκριση. Το ποσοστό ciclesonide το οποίο συνδέεται με τις ενδοφλέβιες πρωτεΐνες του πλάσματος ήταν κατά μέσο όρο 99%, και εκείνο του ενεργού μεταβολίτη της ήταν 98-99%, υποδεικνύοντας μια σχεδόν πλήρη σύνδεση της κυκλοφορούσας ciclesonide/του ενεργού μεταβολίτη της με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ: Η ciclesonide υδρολύεται κυρίως στο βιολογικούς ενεργό του μεταβολίτη μέσω των ενζύμων της εστεράσης στον πνεύμονα. Μια διερεύνηση του περαιτέρω ενζυμικού μεταβολισμού από τα μικροσώματα του ανθρώπινου ήπατος έδειξε ότι αυτή η ένωση μεταβολίζεται, με κατάλυση από το CYP3A4, κατά κύριο λόγο σε υδροξυλιωμένους ανενεργούς μεταβολίτες. Επιπλέον, οι αναστρέψιμες, εστερικές, Αποφύλες, αυξήσεις ενόσιες του ενεργού μεταβολίτη με λιπαρά όξια αναγινώσκονται στους πνεύμονες. ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ: Η ciclesonide, μετά από του στόματος και από ενδοφλέβια χορήγηση, απεκκρίνεται κυρίως μέσω των κοπρώνων (67%), γεγονός που υποδεικνύει ότι η απέκκριση μέσω της χολής είναι η κύρια οδός απομάκρυνσης της. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ σε ασθενείς: ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΣΘΜΑ: Η ciclesonide δεν παρουσιάζει φαρμακοκινητικές αλλαγές σε ασθενείς με ήπιο άσθμα συγκριτικά με υγιή άτομα. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΝΕΦΡΙΚΗ Η ΗΠΑΤΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ, ΗΛΙΚΙΩΜΕΝΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ: Η ηλικία δεν επηρεάζει τη συστηματική έκθεση στον ενεργό μεταβολίτη, σύμφωνα με πληθυσμιακές φαρμακοκινητικές μελέτες. Η μειωμένη ηπατική λειτουργία μπορεί να επηρεάσει την απομάκρυνση των κορτικοστεροειδών. Σε μια μελέτη που περιλάμβανε ασθενείς με διαταραγμένη ηπατική λειτουργία που έπασχαν από ηπατική κίρρωση, παρατηρήθηκε υψηλότερη συστηματική έκθεση στον ενεργό μεταβολίτη. Λόγω της ελαφώς νεφρικής απέκκρισης του ενεργού μεταβολίτη, μελέτες σε ασθενείς με μειωμένη νεφρική λειτουργία δεν έχουν πραγματοποιηθεί. **5.3 Προκλινικά δεδομένα** για την ασφαλέα Τα προκλινικά δεδομένα με τη ciclesonide δεν αποκάλυψαν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα για τον άνθρωπο με βάση τις συμβατικές μελέτες φαρμακολογικής ασφάλειας, τοξικότητας επαναλαμβανόμενων δόσεων, γονοτοξικότητας ή ενδεχόμενης καρκινογόνου δράσης. Σε μελέτες αναπαραγωγικής τοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα, αποδείχθηκε ότι τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν συγγενείς διαμνητικές (λυκωσμός, σκελετικές δυσμορφίες). Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα των μελετών σε πειραματόζωα δε φαίνεται να ισχύουν στον άνθρωπο όταν χορηγούνται οι συνιστώμενες δόσεις. Σε δύο μελέτες 12 μηνών σε σκύλους, παρατηρήθηκε στη μέγιστη δόση, μια σχετιζόμενη με τη θεραπεία δράση στις ωοθήκες (ειδικότερα ατροφία). Αυτή η δράση παρατηρήθηκε σε συστηματικές εκδόσεις 5,27 - 8,34 φορές αυτές που σημειώθηκαν στην ημερήσια δόση των 160 μg. Η σημασία αυτού του ευρήματος στον άνθρωπο είναι άγνωστη. Μελέτες σε ζώα με άλλα γλυκοκορτικοειδή έδειξαν ότι η χορήγηση φαρμακολογικών δόσεων γλυκοκορτικοειδών κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για καθυστέρηση της ενδομητρίου ανάπτυξης, για καρδιαγγειακή και/ή μεταβολική νόσο των ενήλικων και/ή για μόνιμες αλλαγές στην πυκνότητα του υποδόχνη των γλυκοκορτικοειδών, να ανακλύχουν νευρομεταβιβάσιμα και συμπεριφορά. Η συσχέτιση αυτών των στοιχείων με ανθρώπους που λαμβάνουν ciclesonide δια εισπνοής είναι άγνωστη. **6. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ. 6.1 Κατάλογος εκδόχων** Νορφολουόνη (HFA-134a), Αιθανόλη, άνυδρη. **6.2 Ανομοιότητα** Δεν εφαρμόζεται. **6.3 Διάρκεια ζωής** 30 δοσιμετρικοί ψεκασμοί. 1 χρόνο. **6.4 Ημερήσιες προετοιμασίες κατά τη φύλαξη του προϊόντος** Δεν υπάρχουν ειδικές οδηγίες διατήρησης για το προϊόν αυτό. **6.5 Ημερήσιες προετοιμασίες κατά τη φύλαξη του προϊόντος** Μετά τον εκθέσει σε θερμοκρασίες άνω των 50 °C. Ο περικήτης δεν πρέπει να τρυπηθεί, να σπαστεί ή να καεί ακόμα και όταν είναι εμφανώς άδειος. **6.5 Φύση και συστατικά του περιέκτη** Η δοσιμετρική συσκευή αποτελείται από ένα υπό πίεση περιέκτη αλουμινίου και σφραγισμένη με δοσιμετρική βαλβίδα, ακροφύσιο και κάλυμμα. 30 δοσιμετρικοί ψεκασμοί, 60 δοσιμετρικοί ψεκασμοί, 120 δοσιμετρικοί ψεκασμοί. Νοσοκομειακές συσκευασίες: 10 x 30 δοσιμετρικοί ψεκασμοί, 10 x 60 δοσιμετρικοί ψεκασμοί, 10 x 120 δοσιμετρικοί ψεκασμοί. Μπορεί να μην κυκλοφορούν όλες οι συσκευασίες. **6.6 Ιδιαίτερες προφυλάξεις απόρριψης και άλλος χειρισμός** Θα πρέπει να δοθούν στους ασθενείς προεπικτικές οδηγίες για την ορθή χρήση της δοσιμετρικής συσκευής (βλ. Φύλλο Οδηγιών Χρήσης). Όπως με τα περισσότερα εισπνεύσιμα προϊόντα που περιέχουν υπό πίεση, η θεραπευτική επίδραση αυτού του φαρμακευτικού προϊόντος μπορεί να μειωθεί όταν ο περικήτης είναι ψυχρός. Παρόλα αυτά, το Alvesso παρέχει μια σταθερή δόση σε θερμοκρασίες από -10°C έως 40°C. **7. ΚΑΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΔΕΛΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ** Υπεύθυνος κυκλοφορίας: Nycomed Hellas S.A. Λεωφ. Ηφισίας 166, 152 31 Χαλάνδρι, Αθήνα, Τηλ.: 210 6729570. **8. ΑΡΙΘΜΟΣ(ΟΙ) ΔΕΛΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ** 48248/24-09-2008. **9. ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΡΩΤΗΣ ΕΓΚΡΙΣΗΣ / ΑΝΑΝΕΩΣΗΣ ΤΗΣ ΔΕΛΕΙΑΣ** 17-06-2005. **10. ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ** 24-09-2008 **Alvesso® MDI 160 μg x 60 εισπνοές: Α.Τ.: 34,05 € / Ν.Τ.: 20,13 €**

Βοηθείστε να γίνουν τα φάρμακα πιο ασφαλή:
Συμπληρώστε την "ΚΙΤΡΙΝΗ ΚΑΡΤΑ"
Αναρρώστε:
• Όλες τις ανεπιθύμητες ενέργειες
• Για τα Νέα Φάρμακα
• Τις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες
για τα Γνωστά Φάρμακα