

## Στη μνήμη του Δημήτρη Τζιόβα



Είναι πολύ νωπές οι μνήμες όλων μας για την πρόσφατη απώλεια του φίλου και συναδέλφου Δημήτρη Τζιόβα. Του συναδέλφου με το ξεστό χαμόγελο και την πηγαία έκφραση ελπίδας για τους ασθενείς. Του Δημήτρη που έτρεχε στο θάλαμο περισσότερο από όλους μας κι όλοι μας τον θαυμάζαμε κι απορούσαμε πού έβρισκε τόση δύναμη.

Ο Δημήτρης δεν λύγιζε στα καθημερινά προβλήματα της δουλειάς. Έπεφτε, όπως πέφταμε όλοι μας, αλλά σηκωνόταν πρώτος και βοηθούσε κι εμάς να σηκωθούμε. Μας τόνωνε η φωνή του, μας εμφύχωνε η προσπάθειά του και πιστεύαμε ότι μπορούμε και εμείς να τρέξουμε, αφού βλέπαμε εκείνον να τρέχει.

Ο συνάδελφος Δημήτρης Τζιόβας είχε έναν μοναδικό τρόπο να κινητοποιεί τους συναδέλφους για ομαδική δουλειά. Μας συγκέντρωνε όταν χωριζαμε, μας ένωνε όταν νιώθαμε πως διαλυόμαστε και μας συντόνιζε όταν αποσυντονιζόμαστε. Έδινε την ψυχή του για την ομαδική δουλειά και έπαιρνε πάνω του τη δουλειά των άλλων όταν μερικοί δεν μπορούσαν. Κι όλα αυτά με μια απόλυτη φυσικότητα, ηρεμία. Χωρίς να διατυμπανίζει ότι δουλεύει περισσότερο, ότι σηκώνει το μεγαλύτερο βάρος. Με την απλότητα και σεμνότητα που χαρακτηρίζει κάθε πραγματικό άνθρωπο. Με την ηρεμία και καρτερικότητα που χαρακτηρίζει τον πράο και αισιόδοξο άνθρωπο.

Αλλά κι όταν χτυπήθηκε τόσο σκληρά από τη νόσο του καρκίνου, προτίμησε να ανέβει μόνος του τον δικό του Γολγοθά. Να συνεχίσει να προσφέρει στον έξω κόσμο, σε όλους εμάς, το χαμόγελό του, την αισιοδοξία του. Κι εμείς τότε, αντί να του δώσουμε κουράγιο, παίρναμε κουράγιο, για να το δώσουμε στον εαυτό μας όταν θα μας χρειαζόταν αργότερα, που θα μέναμε μόνοι μας. Που θα συλλογιόμασταν πού άραγε βρήκε ο Δημήτρης τη δύναμη να μας συζητάει για πολιτική, για τον τάδε άρρωστο, για γενικά θέματα...

Ο Δημήτρης όμως ήξερε ότι η προσφορά δεν μετριόταν με το πόσο έδωσες και πόσο πήρες. Για αυτό ακόμα και στις δύσκολες στιγμές του, έδινε παρά έπαιρνε. Χάριζε και τότε κουράγιο και εισέπραττε τα δικά μας σαστισμένα χαμόγελα.

Κι όταν όλα τέλειωσαν, εμείς που μείναμε πίσω μόνοι, χωρίς αυτόν, δίνουμε μια απλή υπόσχεση στους εαυτούς μας: Να προσπαθήσουμε να δώσουμε στον ασθενή μας ότι έδινε αυτός όλα τα χρόνια.

Αυτό μόνο και τίποτε άλλο. Πιστεύω ότι θα του αρκεί...

*Βλ. Πολυχρονόπουλος*

## Βραβευμένη Εργασία

2<sup>ο</sup> βραβείο ολοκληρωμένης  
εργασίας 10<sup>ου</sup> Πανελληνίου  
Συνεδρίου Νοσημάτων Θώρακος

# Επιδημιολογική διερεύνηση με μοριακές τεχνικές κλινικών στελεχών *Mycobacterium tuberculosis*

Γ. Βρυώνη<sup>1,2</sup>  
Ε. Μαρίνης<sup>1</sup>  
Π. Ματσιώτα-Bernard<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων, NNΘΑ “Σωτηρία”, <sup>2</sup>Laboratoire de Microbiologie, Hopital Raymond Poincaré, Paris, France.

Λέξεις κλειδιά: Επιδημιολογία, *M. tuberculosis*, RAPD μέθοδος, RFLP μέθοδος

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Η ανίχνευση της πηγής μόλυνσης από *Mycobacterium tuberculosis* αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τον έλεγχο μετάδοσης της φυματίωσης. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να συγκριθούν δύο διαφορετικές μοριακές μέθοδοι: Οι αναλύσεις RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) και RAPD (Random Amplified Length Polymorphic DNA) για την επιδημιολογική διερεύνηση κλινικών στελεχών *M. tuberculosis*. Υλικό από τέλεσαν στελέχη *M. tuberculosis* απομονούμενα από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων σε διάστημα δύο χρόνων (1997-1998). Η ανάλυση RFLP, με τη χρησιμοποίηση του μη ραδιοσημασμένου ανιχνευτή (probe) IS6110, εφαρμόστηκε σε 25 μη σχετιζόμενα μεταξύ τους, ευαίσθητα στα διάφορα αντιφυματικά, κλινικά στελέχη *M. tuberculosis*, καθώς και σε στελέχη απομονούμενα από οικογένειες ασθενών. Με την ανάλυση RAPD μελετήθηκαν 17 ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη και 43 ανθεκτικά στην ισονιαζίδη, άσχετα μεταξύ τους, στελέχη *M. tuberculosis*, καθώς και στελέχη από επιδημίες εντός οικογενειών. Για την RAPD χρησιμοποιήθηκε α) συνδυασμός τριών εκκινητών (primers): A1245 με νουκλεοτιδική αλληλουχία 5'GCCGCCGAAACGATCTAC-3', B1245 (5'-AGGTGGCGTCGAGGAAGAC-3'), και Leg2 (5'-CTGGCTTCTCCAGCTTCA-3') και β) ένας μόνο primer: IRIS (5'GAGTCTcrGGAC(A+T)(C+T)(A+G)CCGGGGCGGTTCA-3'). Και οι δύο μέθοδοι τυποποίησαν με επιτυχία σχετιζόμενα και μη στελέχη *M. tuberculosis*. Σε σχέση με την RFLP, η RAPD ήταν πιο εύκολη και οικονομική στην εφαρμογή της, ειδικά με την χρησιμοποίηση του primer IRIS, που φάνηκε να έχει τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. *Πνεύμων 2000, 13 (2): 102-107*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φυματίωση παραμένει σοβαρό πρόβλημα της Δημόσιας Υγείας σε όλες τις αναπτυσσόμενες χώρες. Τα τελευταία όμως δέκα χρόνια, με την εμφάνιση του AIDS και την ευρεία μετακίνηση αλλοδαπών από πε-

ριοχές όπου ενδημεί η νόσος, η φυματίωση έχει καταστεί πρόβλημα και για τις αναπτυγμένες χώρες<sup>1</sup>. Η αύξηση αυτή συνοδεύεται από αύξηση της απομόνωσης στελεχών *M. tuberculosis* ανθεκτικών σε ένα ή περισσότερα αντιφυματικά φάρμακα<sup>2</sup>. Στις ΗΠΑ, 13% περίπου των νέων περιπτώσεων φυματίωσης είναι ανθεκτικές σε ένα τουλάχιστον πρωτεύον αντιφυματικό φάρμακο και 3.2% σε ισονιαζίδη/ριφαμπικίνη<sup>3</sup>.

Στην Ελλάδα, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της επίπτωσης της φυματίωσης, αποτέλεσμα κυρίως της αθρόας μετανάστευσης ατόμων από χώρες με πολύ υψηλή επίπτωση της νόσου όπως η πρώην Σοβιετική Ένωση και χώρες της Βαλκανικής, Ανατολικής Ευρώπης και Ασίας<sup>4</sup>. Πρόβλημα αποτελεί όχι μόνο η διάγνωση των πασχόντων μεταναστών, αλλά πολύ περισσότερο η παρακολούθησή τους για τη σωστή εφαρμογή της αντιφυματικής θεραπείας, προϋπόθεση απαραίτητη για τη μη εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών. Γεγονός είναι ότι το ποσοστό αντοχής στη ριφαμπικίνη αυξήθηκε από 1.07% το 1996 σε 3,3% το 1998, ενώ το ποσοστό απομόνωσης πολυανθεκτικών στελεχών για το ίδιο διάστημα παρέμεινε σταθερό στο 1.8% (αδημοσίευτα αποτελέσματα του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων).

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος, πρωτεύοντα ρόλο παίζει η επιλογή των κατάλληλων εργαστηριακών μεθόδων, οι οποίες επιτρέπουν, όχι μόνο την όσο το δυνατόν ταχύτερη διάγνωση της νόσου, αλλά και την ανεύρεση της πηγής μόλυνσης. Η φυματίωση μεταδίδεται κυρίως από άτομο σε άτομο, άρα η εξέταση των ατόμων που ήρθαν σε επαφή με τον πάσχοντα, καθώς και η ανίχνευση της πηγής μόλυνσης, αποτελούν παράγοντες πολύ σημαντικούς στον έλεγχο διασποράς του μυκοβακτηριδίου. Προς την κατεύθυνση αυτή σημαντικό ρόλο παίζουν οι τεχνικές μοριακής βιολογίας, οι οποίες επιτρέπουν την ταχεία διάγνωση τυχόν ανθεκτικού στελέχους *M. tuberculosis* και την ιχνηλάτηση με ιδιαίτερη ακρίβεια της πηγής μόλυνσης<sup>5</sup>.

Οι μοριακές μέθοδοι δακτυλικών αποτυπωμάτων (fingerprinting), με τη χρησιμοποίηση της επαναλαμβανόμενης μέσα στο μυκοβακτηριδιακό γονιδίωμα ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας IS6110, ως επιδημιολογικού δείκτη, γνώρισαν ευρεία εφαρμογή στην τυποποίηση κλινικών στελεχών *M. tuberculosis*<sup>6,7</sup>. Μεταξύ αυτών, η RFLP είναι η πιο διαδεδομένη<sup>6,8</sup>, αν και

υπάρχουν και άλλες μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά ή κάτω από ορισμένες συνθήκες όπως η spoligotyping και η randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)<sup>9,10</sup>. Στη παρούσα μελέτη, στόχος ήταν η σύγκριση δύο διαφορετικών μοριακών τεχνικών για την τυποποίηση στελεχών *M. tuberculosis* που απομονώθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων: Η ανάλυση RAPD με συνδυασμό τριών εκκινητών (primers) ή με έναν primer και η ανάλυση RFLP με μη ραδιοσημασμένο ανιχνευτή (probe) IS6110.

## ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΣ

### Στελέχη *M. tuberculosis*

Με την ανάλυση RFLP τυποποιήθηκαν 25 ευαίσθητα στελέχη *M. tuberculosis* από ασθενείς που, από το ιστορικό τους, φαινόταν ότι δεν είχαν σχέση μεταξύ τους. Με την μέθοδο RAPD μελετήθηκαν 17 ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη και 43 ανθεκτικά στην ισονιαζίδη στελέχη *M. tuberculosis*, ομοίως άσχετα μεταξύ τους. Και με τις δύο μεθόδους μελετήθηκαν τρία στελέχη από ασθενείς της ίδιας οικογένειας και έξι στελέχη από ασθενείς τριών διαφορετικών οικογενειών. Τέλος, τα 25 στελέχη που τυποποιήθηκαν με την RFLP, τυποποιήθηκαν και με την RAPD με τον IRIS primer. Όλα τα στελέχη απομονώθηκαν σε διάστημα δύο χρόνων (1997-1998).

### Απομόνωση DNA *M. tuberculosis*

Μεμονωμένες αποικίες *M. tuberculosis*, σε σωληνάρια L-J, ανακαλλιεργήθηκαν σε ζωμό Middlebrook 7H9, εμπλουτισμένο με 10% OADC. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και απομόνωση του DNA των μυκοβακτηριδίων από το ίζημα, με τη χρησιμοποίηση της ρητίνης Chelex (Perkin Elmer, New Jersey, USA). Συγκεκριμένα, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό και σε αυτό προστέθηκε διπλάσιος όγκος αντιδραστήριου. Ακολούθησε θέρμανση στους 95°C επί 25-30min για το σπάσιμο του μυκοβακτηριδιακού κυττάρου, φυγοκέντρηση και αποχωρισμός του υπερκείμενου, το οποίο περιείχε το DNA<sup>11</sup>.

### Ανάλυση Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Το DNA του μυκοβακτηριδίου επωάστηκε με το περιοριστικό ένζυμο PstI επί 18 ώρες και διαχωρίστηκε ηλεκτροφορητικά σε 0.8% γέλη αγαρόζης. Η γέλη επωάστηκε μία φορά σε 0.25M HCl επί 15min, δύο φορές σε 1.5M NaCl-0.5M NaOH, 15min έκαστη, και δυο φορές σε IM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, 15min έκαστη. Μετά την μεταφορά του DNA σε φίλτρο Hybond N (Amersham), έγινε υβριδισμός με IS6110 probe σημασμένο με acetoxy-acetylaminofluorene (AAF-IS6110). Για την ανίχνευσή του χρησιμοποιήθηκε αρχικά anti-AAF αντίσωμα (Eurogentec), στη συνέχεια alkaline phosphatase-anti-αντίσωμα (Biosys) και τελικά το ανάλογο υπόστρωμα<sup>12</sup>.

### Ανάλυση Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Η RAPD ή Arbitrarily primed PCR (PCR αυθαίρετων εκκινητών, AP-PCR) είναι μέθοδος DNA δακτυλικών αποτυπωμάτων (fingerprinting), η οποία έχει δυο σημαντικές διαφορές από την κλασική PCR: 1) προστίθεται ένας primers μικρού μεγέθους (-10bp), αντί για ζεύγος, και 2) η θερμοκρασία σύνδεσης (annealing) είναι χαμηλή (36-45°C), αντί για 55-60°C. Αποτέλεσμα είναι η σύνδεσή του primer σε διάφορες θέσεις και στις δύο έλικες του DNA στόχου. Με τον τρόπο αυτό γεννιούνται διάφορα τμήματα DNA τα οποία διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά και μπορεί έτσι να τυποποιηθούν διάφορα μικρόβια<sup>11</sup>.

Οι primers που επιλέχθηκαν ήταν τέσσερις: Ο A1245 (5'GCCGCCGAAACGATCTAC-3', αποτελέσματα με κεφαλαία γράμματα), ο B1245 (5'-AGGTGGCGTCGAGGAAGAC-3', αποτελέσματα με αριθμούς), ο Leg2 (5'CTGGCTTCTCCAGCTTCA-3', αποτελέσματα με μικρά γράμματα) και ο IRIS με 5'-G A G T C T C C G G A C ( A + T ) ( C + - T)(A+G)CCGGGGCGGTTCA-3', αποτελέσματα με πλάγια γράμματα). Μετά την PCR, τα τμήματα του DNA (fragments) ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% w/v με ενσωματωμένο σε αυτή βρωμιούχο εθίδιο. Τα διαφορετικά ηλεκτροφορητικά profiles έγιναν ορατά με υπεριώδη ακτινοβολία, φωτογραφήθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Διαφορά σε τουλάχιστον μία μπάντα θεωρήθηκε ως διαφορετικό profile, ενώ διαφορά στην ένταση δεν λήφθηκε υπ' όψη.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι μοριακής τυποποίησης κλινικών στελεχών *M. tuberculosis* που απομονώθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων. Η μέθοδος RFLP χρησιμοποιήθηκε για τυποποίηση ευαίσθητων και η RAPD ανθεκτικών, άσχετων μεταξύ τους, στελεχών. Σχετιζόμενα στελέχη, από επιδημίες φυματίωσης εντός οικογενειών, τυποποιήθηκαν και με τις δύο μεθόδους: IS6110-RFLP και RAPD, με μόνο τον DUS primer.

Η μοριακή τυποποίηση ήταν επιτυχής και με τις δύο μεθόδους. Τα 25 άσχετα στελέχη παρουσίασαν πολυμορφισμό με την RFLP και RAPD (IRIS primer), ενώ τα σχετιζόμενα στελέχη ήταν ίδια με ανάλυση RFLP και RAPD (IRIS και συνδυασμός τριών άλλων primers). Στη μελέτη μας, σχετιζόμενα και μη στελέχη παρουσίαζαν περισσότερες από 6 μπάντες. Αν και όλα τα στελέχη που τυποποιήθηκαν με RFLP ήταν ευαίσθητα, έχει δειχθεί από προηγούμενη μελέτη ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του RFLP profile και του φαινοτύπου αντοχής<sup>12</sup>.

Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της RAPD με το συνδυασμό των τριών primers και του είδους της μετάλλαξης στο groB γονίδιο, προκειμένου για τα ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη στελέχη, έδειξε καθαρά ότι στελέχη με τα ίδια groB αλληλία μπορεί να έχουν διαφορετικά RAPD profiles (π.χ. στελέχη N322 και N836) και στελέχη με το ίδιο RAPD profile μπορεί να έχουν διαφορετικά groB αλληλία (π.χ. στελέχη N98 και N217) (πιν. 1)<sup>13</sup>. Το ίδιο συμβαίνει και με τα ανθεκτικά στην ισονιαζίδη στελέχη, προκειμένου για το katG γονίδιο (πιν. 2). Αυτό σημαίνει ότι κλωνικά σχετιζόμενα μεταξύ τους στελέχη, μπορεί να χωρίζονται σε υποκλώνους με διαφορετικές μεταξύ τους μεταλλάξεις στα groB και katG γονίδια, και ίδιες μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά μπορεί να υπάρχουν σε άσχετα στελέχη *M. tuberculosis*. Όταν χρησιμοποιήθηκε ο IRIS primer, όλα τα ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη και στην ισονιαζίδη στελέχη είχαν διαφορετικά profiles, πράγμα που επιβεβαιώνει αυτό που επισημάναμε προηγουμένως: Στελέχη με τις ίδιες μεταλλάξεις στα groB και katG γονίδια ήταν άσχετα μεταξύ τους.

Ο IS6110 θεωρείται ως ο σπουδαιότερος επιδημιολογικός δείκτης του *M. tuberculosis*. Κάθε στέλεχος *M. tuberculosis* έχει πολλά αντίγραφα της εμβόλιμης ακολουθίας IS6110. Η διακριτική ικανότητα επομένως της

Πίνακας 1. Επιδημιολογική διερεύνηση *M. tuberculosis* ανθεκτικών στη ριφαμπικίνη.

Κλινικά στελέχη	Μεταλλάξεις <i>rpoB</i> γονίδιο	RAPD profile με A1245	RAPD profile με B1245	RAPD profile με <i>Leg1</i>	RAPD profile με IRIS
<b>N322</b>	<b>Ser531→Leu</b>	<b>B</b>	<b>1</b>	<b>a</b>	<b>A</b>
N299	Ser531→Leu	A	1	b	<b>B</b>
<b>N836</b>	<b>Ser531→Leu</b>	<b>F</b>	<b>4</b>	<b>e</b>	<b>C</b>
N298	Ser531→Leu	A	1	a	<b>D</b>
N127	Ser508→Thr Ser531→Leu	A	1	a	E
<b>N98</b>	<b>Asp516→Val</b> <b>Ser531→Leu</b> <b>Phe505→Leu</b>	<b>A</b>	<b>1</b>	<b>a</b>	<b>F</b>
N365	Ser508→Thr	B	1	a	G
N389	His526→Asp	B	1	a	H
N452	προσθήκη	C	1	c	<b>K</b>
N545	Ser531→Leu	E	3	a	<b>L</b>
<b>N217</b>	<b>Asp516→Val</b>	<b>A</b>	<b>1</b>	<b>a</b>	<b>M</b>
N939	Ser508→Thr	G	5	f	<b>N</b>
N200	Ser531→Leu	A	1	a	<b>O</b>
N634	μη ανίχνευση	ND	ND	ND	<b>ND</b>
N17	Ser531→Leu	ND	ND	ND	<b>ND</b>
N457	His526→Asp	D	2	d	<b>P</b>
N946	His526→Asp	G	6	f	<b>Q</b>

ND = non detected

IS6110 RFLP αυξάνει ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων<sup>14</sup> και μένει να εξετασθεί η περίπτωση ομάδων στελεχών με μικρό αριθμό μπαντών. Πρόσφατα περιγράφηκαν μέσα στο γονιδίωμα του *M. tuberculosis* εμβόλιμες ακολουθίες (IS) με νουκλεοτιδική αλληλουχία ανάλογη του IS6110<sup>15</sup>. Έτσι λοιπόν, μερικές μη ειδικές αντιδράσεις, σε στελέχη με μικρό αριθμό IS6110 αντιγράφων, μπορεί να ευνοηθούν με την ελάττωση της θερμοκρασίας υβριδισμού<sup>16</sup>.

Στη μελέτη μας, εκτός από τη μέθοδο RFLP, η ανάλυση RAPD με τη χρησιμοποίηση διαφόρων εκκινητών τυποποίησε επίσης με επιτυχία τα υπό εξέταση στελέχη. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των διαφόρων primers, είδαμε ότι ήταν απαραίτητος ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των τριών primer A1245/B1245/Leg1 για την τυποποίηση των στελεχών, ενώ ο IRIS είχε την ικανότητα αυτή από μόνος του. Επίσης, για την πλήρη διάκριση των ανθεκτικών στελεχών, ήταν απαραίτητη η γνώση των μεταλλάξεων στα υπεύθυνα

γονίδια. Το επίπεδο βέβαια διαχωρισμού ήταν υψηλότερο με τη χρησιμοποίηση του IRIS, σε σχέση με τους άλλους τρεις primers. Ο IRIS είναι 28-μερές σε σύγκριση με τους άλλους primers που είναι 18-μερή, ενώ είναι ο μόνος που έχει 3 μικτές βάσεις. Η τυποποίηση του *M. tuberculosis* με τον IRIS είναι ανάλογη με αυτή της ERIC-PCR με την οποία επιτυγχάνεται ανώτερη διαφοροποίηση, παρά με τη βοήθεια του IS6110<sup>17</sup>.

Συμπερασματικά, η αποτελεσματικότητα και των δύο μεθόδων ήταν ικανοποιητική, αφού πέτυχαν να τυποποιήσουν σχετικά και άσχετα στελέχη *M. tuberculosis*. Συγκρινόμενες μεταξύ τους, ως προς την ευκολία και το κόστος, η μέθοδος RAPD, με τη χρησιμοποίηση του IRIS primer, φαίνεται να υπερτερεί. Γενικά, επειδή η RAPD είναι μέθοδος που εξαρτάται από τις εκάστοτε συνθήκες, σε ένα εργαστήριο αναφοράς μπορεί να εφαρμοστεί πάντα με την προϋπόθεση ότι τα υπό εξέταση στελέχη θα μελετούνται ταυτόχρονα και κάτω από τις ίδιες συνθήκες PCR.

Πίνακας 2. Επιδημιολογική διερεύνηση *M. tuberculosis* ανθεκτικών στην ισονιαζίδη.

Κλινικά στελέχη	Μεταλλάξεις <i>katG</i> γονίδιο	RAPD profile <i>A1245</i>	RAPD profile με <i>B1245</i>	RAPD profile με <i>Leg1</i>	RAPD profile με <i>IRIS</i>
N98	ND	A	1	a	<b>A</b>
N217	ND	A	1	b	<b>B</b>
N200	ND	ND	ND	d	<b>C</b>
N946	ND	A	1	e	<b>D</b>
N39	Ser315→Thr Arg463→Leu	A	9	c	<b>E</b>
N62	Ser315→Thr Arg463→Leu	D	9	c	<b>F</b>
N95	Ser315→Thr	C	2	c	<b>G</b>
<b>N96</b>	<b>Ser315→Thr Arg463→Leu</b>	<b>A</b>	<b>1</b>	<b>d</b>	<b>H</b>
N101	Ser315→Thr	C	1	e	<b>K</b>
N106	ND	B	10	f	<b>L</b>
N115	Ser315→Thr	A	10	g	<b>M</b>
<b>N122</b>	<b>Ser315→Thr</b>	<b>A</b>	<b>1</b>	<b>d</b>	<b>N</b>
N123	Ser315→Thr	A	3	c	<b>O</b>
N125	ND	C	3	h	<b>P</b>
N129	ND	B	4	k	<b>Q</b>
N140	Ser315→Thr	B	3	c	<b>R</b>
N152	ND	D	3	c	<b>S</b>
N203	Arg463→Leu	G	5	l	<b>T</b>
N220	Ser315→Thr	E	5	c	<b>Y</b>
N229	Ser315→Thr Arg463→Leu	F	5	m	<b>W</b>
N268	Ser315→Thr Arg463→Leu	G	6	n	<b>X</b>
N269	Ser315→Thr	E	6	o	<b>Z</b>
N270	Ser315→Thr Arg463→Leu	F	7	p	<b>J</b>
N272	Ser315→Thr	G	7	q	<b>V</b>
N273	Ser315→Thr	G	8	r	<b>AB</b>
N510	Ser315→Thr	F	8	s	<b>AC</b>
N552	ND	G	6	t	<b>AD</b>

ND = non detected

## SUMMARY

### *Epidemiological study using molecular typing of M. Tuberculosis isolates*

*Vrioni G., Marinis E., Matsiota-Bernard P.*

*In this study, we tested two rapid molecular methods for the typing of Mycobacterium tuberculosis isolates in the National Tuberculosis Reference Service in Athens, Greece. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis with three different and/or one arbitrary primers and restriction fragment length polymorphism (RFLP), using non radioactive IS6110 probes, were used compara-*

tively for the molecular typing of the isolates. We found that the PCR-based methods used could successfully type both related and unrelated strains. When the methods were compared for cost effectiveness and simplicity, the RAPD analysis with the IRIS primer was found to be the more convenient to our laboratory. The RAPD methods depend on nonspecific priming and PCR conditions, in a reference laboratory however, we compare strains in the same run and under the same PCR conditions. *Pneumon* 2000, 13 (2): 102-107

**Key words:** Epidemiology, *M. Tuberculosis*, RAPD method, RFLP method

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sepkowitz KA, Raffalli J. Tuberculosis at the end of twentieth century. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994, 13:902-907.
2. Riley LW. Drug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1993, 17(Suppl 2): S442-S446.
3. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995, 8:496-514.
4. Τουμπής Μ. Σύγχρονα επιδημιολογικά δεδομένα της φυματίωσης. Στο: Σύγχρονες απόψεις για τη φυματίωση. Κλινικά Φροντιστήρια. Ιατρική Εταιρεία Αθηνών (εκδ), Αθήνα 1998, τόμος 10, τεύχος 3, σελ. 9-19.
5. Wellstood S. Diagnostic mycobacteriology: current challenges and technologies. *Lab Med* 1993, 24:357-361.
6. Swaninathan B, Matar G. Molecular typing methods. In: Percing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds). *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1993, p: 26-50.
7. Mazurek GH, Cave DM, Eisenach KD, Wallace RJ, Bates JH, Crawford JT. Chromosomal DNA fingerprinting patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991, 29:2030-2033.
8. Otal I, Martin C, Vincent V, Frebault L, Thierry D, Gicquel B. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991, 29:1252-1254.
9. Wilson S, Goss S, Drobnewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of mycobacterium reference unit. *J Clin Microbiol* 1998, 36:3385-3388.
10. Welsh J, McClelland M. Characterization of pathogenic microorganisms by genomic fingerprinting using Arbitrarily Primed PCR. In: Percing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds). *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*. American Society for Microbiology Washington D.C. 1993, p.595-602.
11. Matsiota-Bernard P, Waser S, Tassios PT, Kyriakopoulos A, Legakis NJ. Rapid discrimination of *Mycobacterium avium* strains from AIDS patients by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1997, 35:1585-1588.
12. Thierry D, Matsiota-Bernard P, Pitsouni E, Kostopoulos C, Guesdon JL. Use of the insertion element IS6110 for DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates presenting various profiles of drug susceptibility. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993, 6:287-297.
13. Matsiota-Bernard P, Vrioni G, Marinis E. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J Clin Microbiol* 1998, 36:20-23.
14. Fomukong N, Beggs M, Hajj H. Differences in the presence of IS611 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. *Tuber Lung Dis* 1997, 78:109-116.
15. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998, 393:537-544.
16. Wilson SM., Gross S, Drobnewski F. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. *J Clin Microbiol* 1998, 36:3385-3388.
17. Sechi LA, Zanetti S, Dupre I, Dekogu G, Fadda G. Enterobacterial repetitive intergenic consensus as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 1998, 36:128-132.

# Ο "γηράσκων" πνεύμων. Η επίδραση του γήρατος στην αναπνευστική λειτουργία

Επαμεινώνδας Ν. Κοσμάς<sup>1</sup>, MD, FCCP  
Νικόλαος Γ. Κουλούρης<sup>2</sup>, MD, PhD

<sup>1</sup>Πνευμονολόγος, Διδάκτωρ Πανεπιστημίου Αθηνών, Επιμελητής Α Νοσοκομείου "Α. Φλέμιγκ", <sup>2</sup>Πνευμονολόγος, Επίκ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών Πανεπιστημιακή Κλινική Ν.Ν.Θ.Α.

Λέξεις κλειδιά: Ηλικία - Γήρας - Αναπνευστική λειτουργία - Φυσιολογία αναπνοής

Αλληλογραφία:  
Επαμεινώνδας Ν. Κοσμάς, Σπετσών 20, 16673  
Άνω Βούλα, Τηλ: 8955005, Fax: 9658115, E-mail:  
enkosmas@hol.gr

Η εργασία παρελήφθη στις 24/2/2000 και εγκρίθηκε προς δημοσίευση στις 18/5/2000.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Κατά τη διάρκεια της πρώτης 25ετίας της ζωής, οι πνεύμονες και το αναπνευστικό σύστημα διανύουν μία φάση ανάπτυξης και ωρίμανσης μέχρι να αποκτήσουν τη μέγιστη λειτουργικότητά τους. Κατά την υπόλοιπη ζωή, η πρόοδος της ηλικίας συσχετίζεται με μία προοδευτική απώλεια της αναπνευστικής λειτουργικότητας. Η φυσιολογική γήρανση του αναπνευστικού συστήματος αποδίδεται σε δομικές μεταβολές του θωρακικού τοιχώματος (αποτιτανώσεις πλευρών, οστεοπόρωση, κατάγματα σπονδύλων, στένωση μεσοσπονδυλίων διαστημάτων, κύφωση, "πιθοειδής θώραξ"), του πνευμονικού παρεγχύματος (διάταση κυψελίδων και αεροχώρων, ελάττωση της επιφάνειας ανταλλαγής αερίων, απώλεια υποστηρικτικού ιστού των περιφερικών αεραγωγών) και των αναπνευστικών μυών (ελάττωση μυϊκής μάζας, μείωση του αριθμού των μυϊκών ινών τύπου II και των κινητικών νευρώνων, διαταραχές των νευρομυϊκών συνάψεων, μειωμένη σύνθεση μυοσίνης και ελάττωση της λειτουργίας της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσού). Οι σχετιζόμενες με την ηλικία δομικές αλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα διάφορες λειτουργικές μεταβολές, όπως αυξημένη δυσκαμψία του θωρακικού τοιχώματος, μειωμένη ελαστική επαναφορά και αυξημένη διατασιμότητα των πνευμόνων, παγίδευση αέρα, υπερδιάταση και επιδείνωση της ισχύος των αναπνευστικών μυών. Ο βίαια εκπνεόμενος όγκος αέρα στο 1<sup>ο</sup> δευτερόλεπτο της βίαιης εκπνοής (FEV<sub>1</sub>), η ζωτική χωρητικότητα και οι εκπνευστικές ροές ελαττώνονται, με χαρακτηριστική διαμόρφωση της καμπύλης ροής-όγκου που συνιστά δυσλειτουργία των μικρών αεραγωγών. Εμφανίζονται περιοχές με μειωμένη σχέση αερισμού-αιμάτωσης ( $V_A/Q$ ) ως συνέπεια της πρόωμης σύγκλεισης αεραγωγών και έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη ανομοιογένεια  $V_A/Q$ . Η διαχυτική ικανότητα για το μονοξείδιο του άνθρακα με την ηλικία ελαττώνεται λόγω της μείωσης της επιφάνειας ανταλλαγής αερίων. Παρά την επέλευση όλων αυτών των λειτουργικών διαταραχών, το αναπνευστικό σύ-



στημα παραμένει ικανό να διατηρήσει επαρκή ανταλλαγή αερίων κατά την ηρεμία και την άσκηση καθ' όλη την διάρκεια της ζωής του ανθρώπου, με ήπια ελάττωση της μερικής πίεσης του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα ( $PaO_2$ ) και αμετάβλητη τη μερική πίεση του διοξειδίου του άνθρακα ( $PaCO_2$ ). Όμως, με την πρόοδο της ηλικίας και σε περιπτώσεις οξείας νόσου οι εφεδρείες του αναπνευστικού συστήματος τείνουν να ελαττωθούν. Επιπρόσθετα, η με την ηλικία επερχόμενη μείωση της φυσικής δραστηριότητας, με την επακόλουθη απώλεια της φυσικής κατάστασης, η μειωμένη ευαισθησία των αναπνευστικών κέντρων στην υποξία/υπερκαπνία και η μειωμένη δυνατότητα αντίληψης επιπρόσθετων φορτίων ελαστικότητας και αντιστάσεων μπορεί να αμβλύνουν την απόκριση του αερισμού σε διάφορες απειλητικές για τη ζωή νοσηρές καταστάσεις (όπως οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, καρδιακή ανεπάρκεια και υδροστατικό πνευμονικό οίδημα, λοίμωξη ή βρογχόσπασμα) και να οδηγήσουν σε μικρότερη αντίληψη της νόσου και καθυστέρηση της διάγνωσης με πιθανές επιβλαβείς συνέπειες. *Πνεύμων 2000, 13 (2): 108-122*

*Οι Αργίτες βροντοχούγιαξαν ως κύμα πού μονγκρίζει σ'απόκρημνο γιαλό. Σίμωσε τότε κι είπε ο Νέστορας, ο γέρο αλογολάτης, με τρεμόσβηστη φωνή απ' την ανάσα πούφυγε με το φευγιά των χρόνων...*

*Ομήρου Ιλιάδα Β, 340*

*Μετάφραση: Ν. Καζαντζάκη, Ι.Θ. Κακριδή  
Αθήνα 1966*

*"Emphysema is a gross exaggeration of what happens to the lung with advancing years"*

*Bates DV, Christie RV*

*Ciba Foundation Colloquia on Ageing  
Little Brown, Boston, 1955*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 1955 οι Bates και Christie διαπίστωσαν ότι η νόσος πνευμονικό εμφύσημα μοιάζει μορφολογικά με την επίδραση του γήρατος στον πνεύμονα<sup>1</sup>. Ο όρος "γεροντικό εμφύσημα" (senile emphysema) εισήχθη από τότε στην βιβλιογραφία για να περιγράψει τις μεταβολές της αναπνευστικής λειτουργίας με την πρόοδο της βιολογικής ηλικίας. Ο όρος σήμερα θεωρείται αδόκιμος δεδομένου ότι, παρ'όλον που υπάρχουν σημαντικές ομοιότητες στις μεταβολές της πνευμονικής

λειτουργίας μεταξύ εμφύσηματος και γήρανσης του πνεύμονα, οι ανατομικές και παθολογοανατομικές μεταβολές του αναπνευστικού συστήματος στον γηράσκοντα πνεύμονα είναι πολύ διαφορετικές από αυτές του εμφυσηματικού πνεύμονα. Ο δόκιμος όρος που έχει προκύψει κατά τα τελευταία χρόνια στην βιβλιογραφία και που θα χρησιμοποιηθεί και σε αυτήν την ανασκόπηση είναι "γηράσκων πνεύμων" (aging lung).

Κατά την διάρκεια των πρώτων δύο δεκαετιών της ζωής, οι πνεύμονες ευρίσκονται σε διαδικασία ανάπτυξης και ωρίμανσης. Ο μέγιστος αριθμός των κυψελίδων (περίπου 300 εκατομμύρια) έχει δημιουργηθεί στην ηλικία των 10-12 ετών. Στην συνέχεια οι πνεύμονες και το αναπνευ-

στικό σύστημα ακολουθούν την διαδικασία της ωρίμανσης μέχρι την ηλικία των 20 (γυναίκες) - 25 ετών (άνδρες), οπότε έχει επιτευχθεί η μέγιστη λειτουργική ικανότητα του αναπνευστικού συστήματος. Στην υπόλοιπη διάρκεια της ζωής, η αύξηση της ηλικίας σχετίζεται με προοδευτική ελάττωση της λειτουργικότητας του αναπνευστικού συστήματος. Όμως, εφόσον δεν μεσολαβήσει κάποια νόσος, η προοδευτική απώλεια λειτουργικότητας είναι τέτοια ώστε να διατηρείται επαρκής η ανταλλαγή των αερίων καθ'όλη την διάρκεια της ζωής<sup>2,3</sup>.

Κατά ένα μεγάλο μέρος της, η ειδικότητα της Πνευμονολογίας ασκείται σε άτομα γεροντικής ηλικίας και επομένως είναι απαραίτητη η γνώση των λειτουργικών μεταβολών που επέρχονται φυσιολογικά με την πάροδο της ηλικίας. Αυτή η γνώση βοηθά ουσιαστικά στην πληρέστερη προσέγγιση των ασθενών και στην επίλυση συχνά αντιμετωπιζόμενων κλινικών προβλημάτων, όπως π.χ. α. Γιατί γέροντες με ελεύθερο ιστορικό παρουσιάζουν βρογχόσπασμο επ'ευκαιρία κάποιας ιογενούς λοίμωξης (αύξηση βρογχικής υπεραντιδραστικότητας); β. Γιατί δεν αισθάνονται μεγάλη δύσπνοια σε κρίση βρογχόσπασμου ή σε πνευμονικό οίδημα (ελάττωση της αντίληψης επιπρόσθετων φορτίων αντιστάσεων και ελαστικότητας); γ. Γιατί η ακτινογραφία θώ-

ρακα είναι τυπική εμφύσηματος ενώ δεν έχουν καπνίσει ποτέ; δ. Γιατί παρουσιάζουν έντονη δύσπνοια όταν ανέβουν σκάλες ακόμα και επί απουσίας νόσου (αυξημένη απάντηση αερισμού στην άσκηση); ε. Γιατί η  $PO_2$  62 mmHg δεν μπορεί να είναι απόρροια της μεγάλης ηλικίας (η γεροντική ηλικία δεν δικαιολογεί μεγάλη πτώση της  $PO_2$ ); στ. Γιατί η σπιρομέτρηση είναι αποφρακτικού τύπου παρά το ότι ο εξεταζόμενος γέρων δεν πάσχει από κάποια νόσο ή τέλος, ζ. Μπορεί η μεγάλη ηλικία να ευθύνεται για την ανάπτυξη υπερκαπνίας;

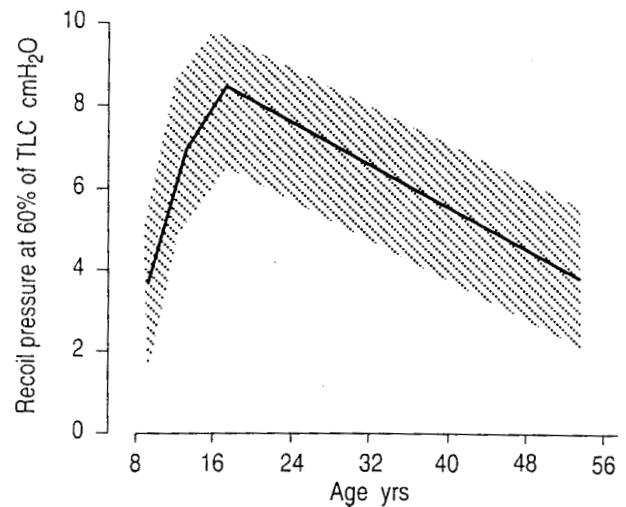
Οι σημαντικότερες προοδευτικές φυσιολογικές μεταβολές του γηράσκοντος αναπνευστικού συστήματος που θα περιγραφούν παρακάτω, οφείλονται σε συγκεκριμένες δομικές αλλαγές του θωρακικού τοιχώματος, των αναπνευστικών μυών και του πνευμονικού παρεγχύματος και έχουν αντίκτυπο στις εξετάσεις λειτουργικού ελέγχου του αναπνευστικού συστήματος, όπως επίσης θα αναπτυχθεί περαιτέρω.

#### ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΓΕΡΟΝΤΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ

##### Α) Η επίδραση της ηλικίας στο πνευμονικό παρέγχυμα

Η στατική πίεση ελαστικής επαναφοράς (elastic recoil) ελαττώνεται προοδευτικά μετά την εφηβική ηλικία (εικόνα 1) περίπου κατά 0.1-0.2 cmH<sub>2</sub>O/έτος και αυτή η ελάττωση είναι περισσότερο εμφανής στους μεγάλους πνευμονικούς όγκους κοντά στην TLC<sup>4,5</sup>. Η στατική καμπύλη πίεσης-όγκου των πνευμόνων μετατοπίζεται προς τα αριστερά και άνω (εικόνα 2) και αποκτά μεγαλύτερη κλίση, υποδηλούσα απώλεια ελαστικότητας και αύξηση της πνευμονικής διατασιμότητας (compliance).

Το ιστολογικό υπόβαθρο της απώλειας ελαστικότητας θεωρείται σήμερα ότι είναι αφ'ενός η διαφοροποίηση της γεωμετρικής τοποθέτησης των ινών ελαστίνης<sup>6</sup> και αφ'ετέρου η διάταση των κυψελιδικών πόρων και σάκκων<sup>5</sup>. Σε πρόσφατη ερευνητική μελέτη με πειραματόζωα<sup>7</sup> έχει δειχθεί ότι η διάταση των κυψελιδικών πόρων/σάκκων κατανέμεται ομοιογενώς στον πνεύμονα και, σε πλήρη αντίθεση με ότι παρατηρείται στο εμφύσημα, είναι καθαρά μηχανικό φαινόμενο γιατί

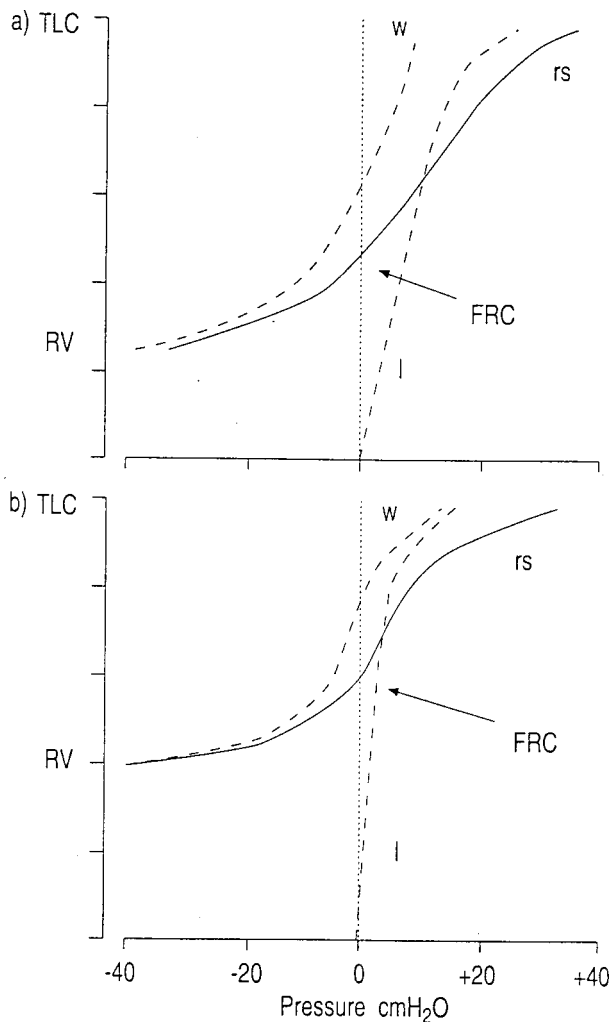


Εικόνα 1. Η μεταβολή της πνευμονικής πίεσης ελαστικής επαναφοράς (recoil pressure) με την αύξηση της ηλικίας. Η πίεση ελαστικής επαναφοράς μετρήθηκε σε πνευμονικό όγκο ίσο με 60% της TLC. Η γραμμοσκιασμένη περιοχή δείχνει τα όρια σταθερής απόκλισης ( $\pm$ SD) των μέσων τιμών (από την βιβλιογραφική αναφορά 4).

δεν υφίσταται καμμία ένδειξη είτε κυτταρικής φλεγμονώδους διήθησης των κυψελιδικών τοιχωμάτων και των μεσοκυψελιδικών διαφραγμάτων είτε καταστροφής του πνευμονικού ιστού.

Σε μελέτες σε ανθρώπους<sup>5,8</sup> έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται η διάμετρος των κυψελιδικών πόρων, οι κυψελίδες γίνονται πιο αβαθείς και αυξάνεται το εύρος τους και οι ελαστικές ίνες στα τοιχώματα των αναπνευστικών βρογχιολίων και των κυψελίδων κατακερματίζονται και αποκτούν ελικοειδή πορεία. Ως αποτέλεσμα αυτών των μεταβολών εμφανίζεται διάταση των κυψελιδικών πόρων και των αεροχώρων, η οποία έχει ομοιογενή κατανομή στον πνεύμονα, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο εμφύσημα που χαρακτηρίζεται από ανομοιογένεια αυτών των μεταβολών. Αυτές οι ηλικιακές μεταβολές είναι ιστολογικά διαφορετικές σε σύγκριση με ότι συμβαίνει στο εμφύσημα (δεν παρατηρείται καταστροφή των κυψελιδικών τοιχωμάτων), έχουν όμως παρόμοια λειτουργικά αποτελέσματα στην διατασιμότητα των πνευμόνων.

Τέλος, η επιπέδωση της εσωτερικής επιφάνειας των κυψελίδων οδηγεί σε προοδευτική ελάττωση της κυψελιδοτριχοειδικής επιφάνειας (75 τ.μ. σε ηλικία 30



Εικόνα 2. Η στατική καμπύλη πίεσης-όγκου των πνευμόνων (l), του θωρακικού τοιχώματος (w) και του αναπνευστικού συστήματος (rs) σε: α) νεαρό άτομο ηλικίας 20 ετών και β) άτομο ηλικίας 60 ετών. Είναι εμφανής στην περίπτωση (β) η μετατόπιση της πνευμονικής καμπύλης προς τα αριστερά και άνω (αύξηση τελοεκπνευστικού όγκου και ελάττωση της μέγιστης πίεσης ελαστικής επαναφοράς) και η αύξηση της μέγιστης (σε θέση TLC) πίεσης ελαστικής επαναφοράς του θωρακικού τοιχώματος (από την βιβλιογραφική αναφορά 4).

ετών, 60 τ.μ. σε ηλικία 70 ετών, μέση ελάττωση 0.27 τ.μ./έτος).

## Β) Η επίδραση της ηλικίας στους αεραγωγούς

Δεν έχουν παρατηρηθεί μείζονες δομικές μεταβολές του αυλού ή του τοιχώματος των αεραγωγών με

την πρόοδο της ηλικίας. Ο επηρεασμός των ροών αέρα στους βρόγχους που θα αναφερθεί παρακάτω, οφείλεται κυρίως στη μεταβολή της πνευμονικής ελαστικότητας και της λειτουργικότητας των αναπνευστικών μυών.

Το μέγεθος των εκπνευστικών ροών εξαρτάται από τον όγκο του πνεύμονα, δηλαδή μεγαλύτερες ροές αέρα επιτυγχάνονται σε υψηλότερους όγκους. Στην κλασική τεχνική της σπироμέτρησης, η βίαιη εκπνοή αρχίζει από θέση TLC και έτσι η αρχική ροή (μέγιστη εκπνευστική ροή, PEF) καθορίζεται από την πίεση ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων και του θωρακικού τοιχώματος και από την ταχύτητα των εκπνευστικών μυών με την οποία παράγουν θετική υπεζωκοτική πίεση. Οι μεταβολές των παραπάνω μηχανικών ιδιοτήτων με την πρόοδο της ηλικίας συντελούν συνολικά ώστε να παρατηρείται μία ήπια ελάττωση της PEF με την ηλικία. Μετά το επίπεδο της PEF που επιτυγχάνεται στην αρχή της βίαιης εκπνοής, οι υπόλοιπες μέγιστες ροές καθορίζονται από ενδογενείς πνευμονικές παραμέτρους, όπως η ελαστική επαναφορά του πνεύμονα, η επιφάνεια διατομής των αεραγωγών (βατότητα, αντιστάσεις) και η διατασιμότητα των αεραγωγών<sup>25</sup>.

Δεδομένης της λειτουργικής ελάττωσης του ελαστικού ιστού που υποστηρίζει τους αεραγωγούς, οι μικροί αεραγωγοί (διαμέτρου < 2 mm) παρουσιάζουν τάση σύγκλεισης (πρώιμη σύγκλειση αεραγωγών) στο τέλος της βίαιης εκπνευστικής τεχνικής σε χαμηλούς πνευμονικούς όγκους που ενδέχεται να παρατηρηθεί και στην ήρεμη αναπνοή. Σε αυτήν οφείλεται η μεταβολή του σχήματος της εκπνευστικής καμπύλης ροής-όγκου με την χαρακτηριστική κοίλανση (scooping).

## Γ) Η επίδραση της ηλικίας στο θωρακικό τοίχωμα

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στο πνευμονικό παρέγχυμα, η ελαστικότητα του θωρακικού τοιχώματος αυξάνεται προοδευτικά με την ηλικία. Αυτή η αύξηση της ελαστικότητας ή μείωση της διατασιμότητας (stiffness) πιθανότατα οφείλεται<sup>26</sup> αφενός στις εναποθέσεις αλάτων ασβεστίου στους χόνδρους των πλευρών και στις ενώσεις μεταξύ πλευρών και σπονδυλικής στήλης και αφετέρου στη σμίκρυνση (καθίζηση) των μεσοσπονδυλίων δίσκων. Επίσης, η οστεοπόρωση της μεγάλης ηλικίας έχει ως αποτέλεσμα σφηνοειδή ή πλήρη κατάγματα σπονδύλων, που οδηγούν σε μεταβολές του

σχήματος του θώρακα (κύφωση, βαρελοειδής θώρακας ή αύξηση της προσθιοπίσθιας διαμέτρου του θώρακα).

Η συχνότητα των σπονδυλικών καταγμάτων και της συνεπακόλουθης κύφωσης είναι εντυπωσιακά μεγάλη. Σε ηλικία 75-80 ετών, περίπου το 65% των γυναικών και το 30% των ανδρών έχουν υποστεί κάταγμα σπονδύλου, συνηθέστερα σφηνοειδές<sup>9</sup>. Σε μία ακτινολογική μελέτη υγιών ανθρώπων ηλικίας 75-93 ετών, βρέθηκε ότι μόνο το 23% αυτών έχουν φυσιολογική σπονδυλική στήλη, ενώ οι υπόλοιποι (77%) παρουσιάζουν ποικίλου βαθμού κύφωση<sup>10</sup>.

Η παραπάνω περιγραφείσα σκελετική διαμόρφωση και αλλαγή της αρχιτεκτονικής του θωρακικού τοιχώματος ίσως να είναι και η κυριότερη αιτία των μεταβολών που παρατηρούνται και στο πνευμονικό παρέγχυμα. Επίσης, οι σκελετικές αυτές μεταβολές δεν επηρεάζουν μόνο την διατασιμότητα του θωρακικού τοιχώματος αλλά και την καμπυλότητα του διαφράγματος, με επακόλουθα αρνητικά αποτελέσματα στην λειτουργικότητά του.

#### **Δ) Η επίδραση της ηλικίας στους αναπνευστικούς μύες**

Με την πάροδο του χρόνου έχουν παρατηρηθεί πολλές μεταβολές των περιφερικών σκελετικών μυών που οδηγούν στη μείωση της ισχύος και της λειτουργικότητάς τους<sup>11</sup>. Οι κυριότεροι παράγοντες που καθορίζουν αυτήν την σχετιζόμενη με την ηλικία μείωση της ισχύος των σκελετικών μυών<sup>5</sup> είναι η ελάττωση της μυϊκής μάζας, η μείωση του αριθμού των μυϊκών ινών τύπου II, οι μεταβολές της λειτουργικότητας των νευρομυϊκών συνάψεων, η διαταραχή των αντλιών ιόντων ασβεστίου, η μειωμένη σύνθεση της μυοσίνης και η προοδευτική απώλεια της λειτουργικότητας της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Όπως και οι περιφερικοί σκελετικοί μύες, ανάλογη επίδραση της ηλικίας υφίστανται και οι αναπνευστικοί σκελετικοί μύες<sup>12,13</sup>.

Εκτός όμως από αυτήν την πρωτογενή επίδραση του γήρατος στην βιοσύνθεση, βιοχημεία και λειτουργία των αναπνευστικών μυών, η λειτουργικότητα των αναπνευστικών μυών και ιδιαιτέρως του διαφράγματος, επηρεάζεται και από πληθώρα δευτερογενών παραγόντων. Η αύξηση της λειτουργικής υπολειπόμενης χωρητικότητας (FRC), η μεταβολή της γεωμετρίας του

θωρακικού τοιχώματος (υπερδιάταση λόγω κύφωσης και αύξησης της προσθιοπίσθιας διαμέτρου του θώρακα) και η συνεπακόλουθη ελάττωση της διατασιμότητάς του, επηρεάζουν δυσμενώς την ικανότητα του διαφράγματος να παράγει επαρκή πίεση μέσω μεταβολής, επί το δυσμενέστερον, της σχέσης μήκους-τάσης<sup>5,6</sup>. Σε πολλές μελέτες υγιών ανθρώπων ηλικίας 65-81 ετών έχει βρεθεί ελάττωση της μέγιστης στατικής διαδιαφραγματικής πίεσης (Pdi) κατά 13-25% σε σύγκριση με νέους ενήλικες<sup>14,15</sup>. Το έργο που έχουν να παράγουν οι εκπνευστικοί μύς αυξάνεται με την ηλικία, δεδομένου ότι η προς τα έξω ελαστική επαναφορά του θωρακικού τοιχώματος (πίεση αντιτιθέμενη στην σύμπτυξη του πνεύμονα, δηλαδή στην εκπνοή) αυξάνεται, ενώ ελαττώνεται η προς τα μέσα ελαστική επαναφορά του πνεύμονα (πίεση που συμβάλλει στην εκπνοή). Το συνολικό αποτέλεσμα είναι ότι η εκπνοή παύει να είναι εντελώς παθητικό φαινόμενο και η εμφάνιση δύσπνοιας είναι ευκολότερη<sup>25</sup>.

Η ισχύς των αναπνευστικών μυών εξαρτάται και από το επίπεδο θρέψης, το οποίο είναι συχνά υπολειμματικό σε ανθρώπους μεγάλης ηλικίας. Έχει αποδειχθεί ότι η υποθρεψία και η νοσηρή ελάττωση του σωματικού βάρους συσχετίζονται με αντίστοιχη ελάττωση της μάζας του διαφράγματος<sup>16</sup> και με ελάττωση της μυϊκής ισχύος των αναπνευστικών μυών<sup>13,17</sup>.

Πρέπει να αναφερθεί επίσης ότι η άριστη λειτουργία των αναπνευστικών μυών είναι άρρηκτα συνυφασμένη με την ιδανική οξυγόνωσή τους, η οποία εξαρτάται από την οξυγόνωση του αρτηριακού αίματος και την αιμάτωση των μυών<sup>18</sup>. Έχουν αποδειχθεί συσχετίσεις μεταξύ παραμέτρων της καρδιακής λειτουργίας, όπως ο καρδιακός δείκτης (CI), η καρδιακή παροχή (CO) ή η μέγιστη κατανάλωση οξυγόνου (VO<sub>2</sub>max) και παραμέτρων της λειτουργικότητας των αναπνευστικών μυών, όπως η μέγιστη εισπνευστική πίεση (MIP), η διαδιαφραγματική πίεση (Pdi) ή η σχέση τάσης-χρόνου του διαφράγματος (TTdi)<sup>19-22</sup>. Η καρδιακή ανεπάρκεια (υπερτασικής ή στεφανιαίας αιτιολογίας) είναι πολύ συχνή στην μεγάλη ηλικία και επομένως είναι αναμενόμενο ότι η αιμοδυναμική επιβάρυνση επιδρά αρνητικά στην λειτουργικότητα των αναπνευστικών μυών.

Άλλες συχνές κλινικές καταστάσεις της γεροντικής ηλικίας όπως η νόσος Parkinson και η αγγειακή εγκε-

φαλοπάθεια μειώνουν επίσης την λειτουργικότητα των αναπνευστικών μυών<sup>23,24</sup>.

Οι δομικές και μορφολογικές μεταβολές του φυσιολογικού αναπνευστικού συστήματος στην γεροντική ηλικία συνοψίζονται στον Πίνακα 1, ενώ τα λειτουργικά επακόλουθα αυτών των ηλικιακών μεταβολών αναφέρονται στον Πίνακα 2.

## ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΗ ΓΕΡΟΝΤΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ

### A) Πνευμονικοί όγκοι

Οι μεταβολές των πνευμονικών όγκων με την πρόοδο της ηλικίας<sup>5,25</sup> απεικονίζονται στην εικόνα 3.

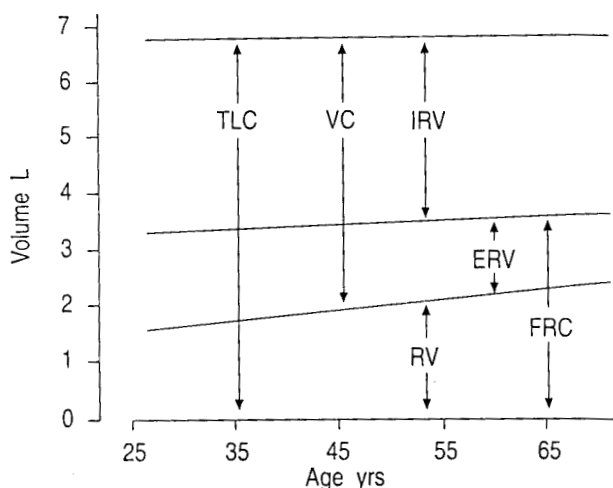
Η ολική πνευμονική χωρητικότητα (TLC) καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ της μέγιστης εισπνευστικής πίεσης που τείνει να εκπτύξει συνολικά το ανα-

*Πίνακας 1. Δομικές - μορφολογικές μεταβολές του φυσιολογικού αναπνευστικού συστήματος στη γεροντική ηλικία*

<i>Πνευμονικό παρέγχυμα</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Διάταση τελικών αεροχώρων (κυψελιδ. πόρων &amp; σάκκων)</li> <li>2. Κυψελίδες αβαθείς και αυξημένου εύρους</li> <li>3. Διαταραχή γεωμετρίας συνδετικού ιστού (κατακερματισμός &amp; ελικοειδής πορεία ινών ελαστίνης)</li> <li>4. Ελάττωση ελαστικού ιστού</li> </ol>
<i>Αεραγωγοί</i>	Δεν παρατηρούνται δομικές μεταβολές
<i>Θωρακικό τοίχωμα</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Εναπόθεση αλάτων ασβεστίου σε χόνδρους πλευρών &amp; πλευροσπονδυλικές διαρθρώσεις</li> <li>2. Σμίκρυνση (καθίζηση) μεσοσπονδυλίων δίσκων</li> <li>3. Οστεοπόρωση</li> <li>4. Κατάγματα σπονδύλων (υποκλινικά)</li> <li>5. Μεταβολές σχήματος θώρακα (κύφωση, πιθοειδής θώραξ)</li> </ol>
<i>Αναπνευστικοί μύες</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ελάττωση μυϊκής μάζας</li> <li>2. Ελάττωση αριθμού μυϊκών ινών τύπου II</li> <li>3. Μεταβολή λειτουργικότητας νευρομυϊκών συνάψεων</li> <li>4. Διαταραχή αντλίας ιόντων ασβεστίου</li> <li>5. Μειωμένη σύνθεση μυοσίνης</li> <li>6. Μείωση οξειδωτικής ικανότητας των μιτοχονδρίων</li> <li>7. Επιπλέον επηρεασμός της λειτουργικότητας των μυών από μεταβολές αρχιτεκτονικής &amp; ελαστικότητας πνευμόνων και θωρακικού τοιχώματος, από κατάσταση θρέψης, από συνυπάρχουσα νοσηρότητα (καρδιακή ανεπάρκεια, αγγειακή εγκεφαλοπάθεια, νόσο Parkinson κλπ.)</li> </ol>

*Πίνακας 2. Λειτουργικές συνέπειες των δομικών-μορφολογικών μεταβολών του φυσιολογικού αναπνευστικού συστήματος στη γεροντική ηλικία.*

<i>Πνευμονικό παρέγχυμα</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ελάττωση ελαστικής επαναφοράς (elastic recoil) πνευμόνων</li> <li>2. Αύξηση πνευμονικής διατασιμότητας (lung compliance)</li> <li>3. Ελάττωση δραστηκής κυψελιδοτριχοειδικής επιφάνειας</li> <li>4. Επηρεασμός λειτουργίας αναπνευστικών μυών</li> </ol>
<i>Αεραγωγοί</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Απόφραξη της εκπνευστικής ροής αέρα</li> <li>2. Δυσλειτουργία περιφερικών αεραγωγών</li> </ol>
<i>Θωρακικό τοίχωμα</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Αύξηση ελαστικής επαναφοράς θωρακικού τοιχώματος</li> <li>2. Ελάττωση διατασιμότητας (chest wall compliance)</li> <li>3. Επηρεασμός λειτουργίας αναπνευστικών μυών</li> </ol>
<i>Αναπνευστικοί μύες</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ελάττωση μυϊκής ισχύος</li> </ol>



Εικόνα 3. Συγκριτική μεταβολή των στατικών όγκων με την αύξηση της ηλικίας. TLC: ολική πνευμονική χωρητικότητα, VC: ζωτική χωρητικότητα, IRV: εισπνευστικός εφεδρικός όγκος, ERV: εκπνευστικός εφεδρικός όγκος, FRC: λειτουργική υπολειπόμενη χωρητικότητα, RV: υπολειπόμενος όγκος αέρα (από την βιβλιογραφική αναφορά 6).

πνευστικό σύστημα και των πιέσεων ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων και του θωρακικού τοιχώματος οι οποίες, στην θέση μέγιστης εισπνοής, τείνουν να συμπύξουν τον θώρακα. Έχει βρεθεί ότι η ολική πνευμονική χωρητικότητα (TLC) δεν μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ζωής και αυτό είναι αποτέλεσμα των σύνθετων μεταβολών όλων των παραγόντων που καθορίζουν την TLC με την ηλικία. Στους γέροντες, η μέγιστη εισπνευστική πίεση (MIP) ελαττώνεται με την ηλικία<sup>26</sup> αλλά ίσως αυτή η ελάττωση να έχει σχέση με την αύξηση του υπολειπόμενου όγκου (RV), όπου η MIP μετράται. Η ελαστική επαναφορά του πνεύμονα μειώνεται με την ηλικία, καθιστώντας έτσι τους πνεύμονες ευκολότερα εκπνυσσόμενους μέχρι την TLC. Αυτή η μείωση της πνευμονικής ελαστικότητας τείνει να αυξήσει την TLC. Όμως, με την αύξηση της ηλικίας, όπως προαναφέρθηκε, το θωρακικό τοίχωμα γίνεται περισσότερο ελαστικό και λιγότερο διατάσιμο (stiff) και επομένως, η έχουσα φορά προς το να συμπύξει τον θώρακα (σε υψηλούς όγκους και κατά το τέλος της μέγιστης εισπνοής) ελαστική επαναφορά του θωρακικού τοιχώματος, εμποδίζει την αύξηση της TLC και ισοσκελίζει την τάση για αύξηση της TLC, λόγω μειωμένης ελαστικότητας των πνευμόνων. Αυτή είναι

μία ουσιαστική λειτουργική διαφορά μεταξύ γηράσκοντος πνεύμονος και εμφυσήματος όπου, λόγω της μείωσης της ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων, η TLC αυξάνεται.

Ο υπολειπόμενος όγκος αέρα (RV), που παραμένει στο αναπνευστικό σύστημα μετά από μέγιστη εκπνοή, καθορίζεται από την ισχύ των εκπνευστικών μυών, την ελαστική επαναφορά του πνευμονικού παρεγχύματος και του θωρακικού τοιχώματος και από τον όγκο όπου γίνεται η συμπίεση και σύγκλιση των αεραγωγών και μηδενίζεται η εκπνευστική ροή αέρα. Η ισχύς των εκπνευστικών μυών, όπως αυτή εκτιμάται από την μέγιστη εκπνευστική πίεση (MEP), παρουσιάζει, με την πρόοδο της ηλικίας, μικρή πτωτική τάση<sup>13</sup>. Η ελαστική επαναφορά του πνεύμονα μειώνεται με την ηλικία και δεδομένου ότι ο RV είναι ο όγκος αέρα όπου η ελαστική επαναφορά του πνεύμονα έχει την μικρότερη τιμή της (κοντά στο μηδέν), ο RV αυξάνεται με το γήρας. Η ελαστική επαναφορά του θωρακικού τοιχώματος αυξάνεται με την ηλικία και επειδή έχει φορά προς τα έξω (προς το να εκπύξει δηλαδή το θωρακικό τοίχωμα) οδηγεί και αυτή σε αύξηση του RV. Η σύγκλιση των αεραγωγών γίνεται πρώιμα κατά την διάρκεια της εκπνοής (δηλαδή σε μεγαλύτερο όγκο), δεδομένου ότι υπάρχει απώλεια υποστηρικτικού (ελαστικού) ιστού. Όλες αυτές οι μεταβολές με την ηλικία κατατείνουν στην παγίδευση αέρα (gas trapping), λόγω αύξησης του υπολειπόμενου όγκου (RV) και σε αύξηση της σχέσης RV/TLC, αφού ο RV αυξάνεται ενώ η TLC παραμένει αμετάβλητη. Η ποσοστιαία αύξηση του υπολειπόμενου όγκου υπολογίζεται περίπου σε 40-50% μεταξύ της ηλικίας των 20 ετών και της ηλικίας των 70 ετών.

Στην ίδια περίοδο, η ζωτική χωρητικότητα (VC=TLC-RV) μειώνεται κατά 25% περίπου, δεδομένου ότι η TLC παραμένει αμετάβλητη ενώ ο RV αυξάνεται.

Η λειτουργική υπολειπόμενη χωρητικότητα (FRC) είναι ο όγκος αέρα που παραμένει μέσα στους πνεύμονες στο τέλος της ήρεμης εκπνοής και καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ της πίεσης ελαστικής επαναφοράς των πνευμόνων, που τείνει να μειώσει τον όγκο των πνευμόνων, και της πίεσης ελαστικής επαναφοράς του θωρακικού τοιχώματος, που τείνει να αυξήσει τον όγκο του θωρακικού κλωβού. Οι αντίθετες

μεταβολές των 2 ελαστικών πιέσεων επαναφοράς με την πρόοδο της ηλικίας έχουν ως αποτέλεσμα η ισορροπία πιέσεων να επέρχεται σε μεγαλύτερο πνευμονικό όγκο κατά την εκπνοή και επομένως να αυξάνεται η λειτουργική υπολειπόμενη χωρητικότητα (FRC). Η FRC αυξάνεται με χαμηλούς ρυθμούς, περίπου 100 ml ανά δεκαετία. Λόγω του σχήματος της καμπύλης πίεσης-όγκου του αναπνευστικού συστήματος (εικόνα 2), η αύξηση της FRC συσχετίζεται με αυξημένο ελαστικό φορτίο στους αναπνευστικούς μύες.

Με την πρόοδο της ηλικίας παρατηρείται αύξηση του όγκου σύγκλεισης (CV, ο όγκος στον οποίο αρχίζουν να κλείνουν οι μικροί αεραγωγοί των πνευμονικών βάσεων κατά την διάρκεια της εκπνοής) με αποτέλεσμα να πλησιάζει τον τελοεκπνευστικό όγκο. Η πρόωμη σύγκλειση των αεραγωγών σχετίζεται αιτιολογικά με απώλεια υποστηρικτικού ιστού γύρω από τους μικρούς αυτούς αεραγωγούς. Ο όγκος σύγκλεισης μπορεί να φθάσει στο 55-60% της TLC και περίπου στα επίπεδα της FRC. Σε αυτήν την περίπτωση η αυτόματη αναπνοή γίνεται με ένα σημαντικό ποσοστό περιφερικών αεραγωγών που έχουν κλείσει και δεν συμμετέχουν ενεργά στην ανταλλαγή των αερίων. Αυτός είναι ο κύριος λόγος για την υποξαιμία, την αύξηση της κυψελιδοτριχοειδικής διαφοράς οξυγόνου και την μείωση της διαχυτικής ικανότητας που παρατηρούνται σε μεγάλες ηλικίες.

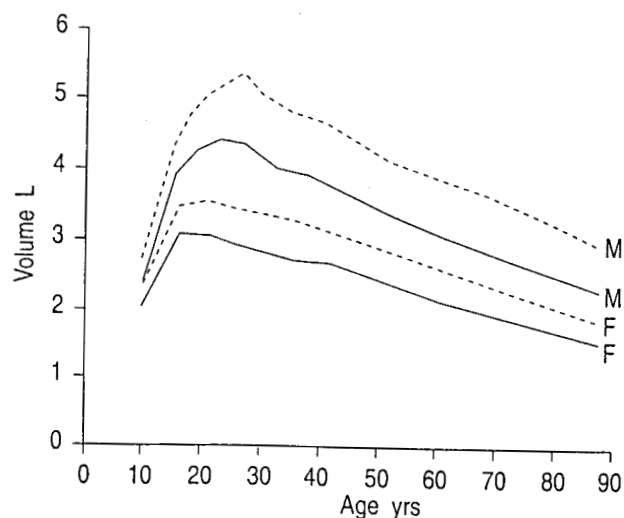
Ο όγκος ήρεμης αναπνοής (VT) δεν μεταβάλλεται με την ηλικία. Η εισπνευστική χωρητικότητα ( $IC = TLC - FRC$ ) και ο εισπνευστικός εφεδρικός όγκος αέρα [ $IRV = TLC - (FRC + VT)$ ] ελαττώνονται σε μικρό βαθμό με την ηλικία ακολουθώντας την αυξητική τάση της FRC. Ο εκπνευστικός εφεδρικός όγκος αέρα ( $ERV = FRC - RV$ ) ελαττώνεται λίγο, δεδομένου ότι η αύξηση του RV είναι μεγαλύτερη από την αύξηση της FRC.

Σε πολύ μεγάλες ηλικίες και δεδομένου ότι ο RV προσεγγίζει περίπου το 50% της TLC, η εκπνευστική ροή της ήρεμης (παθητικής) εκπνοής ελαττώνεται τόσο πολύ ώστε ο εξεταζόμενος δεν μπορεί να εκπνεύσει πλήρως και πρέπει να εισπνεύσει πρίν φθάσει σε όγκο ελαστικής ισορροπίας που είναι η συνήθης FRC. Σε αυτήν την περίπτωση έχουμε δυναμική υπερδιάταση, ο δε τελοεκπνευστικός όγκος αέρα (EELV) είναι μεγαλύτερος από τον όγκο ισορροπίας (FRC).

## Β) Σπυρομέτρηση - Ροομετρία - Μέγιστη εκπνευστική καμπύλη ροής/όγκου

Ο βίαια εκπνεόμενος όγκος αέρα στο 1<sup>ο</sup> δευτερόλεπτο ( $FEV_1$ ) και η βίαιη ζωτική χωρητικότητα (FVC) αυξάνουν μέχρι περίπου την ηλικία των 20 ετών (γυναίκες) - 27 ετών (άνδρες) και κατόπιν ελαττώνονται συνεχώς με την πρόοδο της ηλικίας<sup>26</sup>, όπως φαίνεται στην εικόνα 4. Μακρόχρονες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μία επιταχυνόμενη ελάττωση του  $FEV_1$  και της FVC με την ηλικία και ο ρυθμός της ετήσιας απώλειας είναι μεγαλύτερος στους άνδρες, στους καπνιστές καθώς και στους ασθενείς με βρογχική υπεραντιδραστικότητα<sup>6</sup>. Ο ρυθμός ετήσιας απώλειας του  $FEV_1$  είναι περίπου 20-24 ml σε υγιείς ανθρώπους ηλικίας 25-40 ετών και αυξάνεται σε 35-42 ml μετά την ηλικία των 65 ετών<sup>27</sup>. Η μείωση της FVC με την πρόοδο της ηλικίας οφείλεται κυρίως στην αύξηση του RV και ο ρυθμός της μείωσης αυτής είναι μικρότερος αναλογικά από αυτόν της μείωσης του  $FEV_1$ .

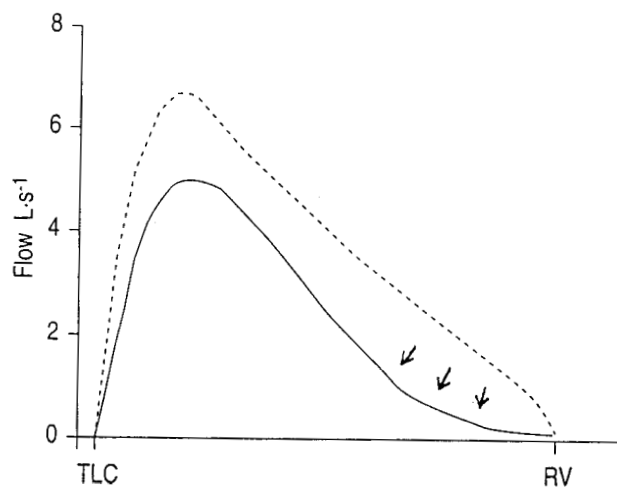
Λόγω αυτού του διαφορετικού ρυθμού μείωσης των  $FEV_1$  και FVC, η σχέση  $FEV_1/FVC$  παραμένει σταθερή μέχρι την ηλικία των 55-60 ετών και κατόπιν ελαττώνεται, όσο μεγαλώνει η ηλικία, σε επίπεδα 65-70%<sup>25,28,29</sup>.



Εικόνα 4. Ελάττωση του  $FEV_1$  (συνεχής γραμμή) και της FVC (διακεκομμένη γραμμή) σε άνδρες (M) και σε γυναίκες (F) με την πρόοδο της ηλικίας (από την βιβλιογραφική αναφορά 26).

Έχουν περιγραφεί χαρακτηριστικές μεταβολές της μέγιστης εκπνευστικής καμπύλης ροής-όγκου που σχετίζονται με την πρόοδο της ηλικίας<sup>30</sup> και οι οποίες διαγράφονται στην εικόνα 5. Οι μεταβολές αυτές της καμπύλης υποδηλούν δυσλειτουργία των μικρών περιφερικών αεραγωγών με ελάττωση των εκπνευστικών ροών ( $FEF_{75}$ ,  $FEF_{25-75}$ ) αποφρακτικού τύπου ακόμα και σε διά βίου μη καπνιστές, κάτι που σημαίνει ότι τέτοιου είδους μεταβολή της καμπύλης μπορεί σε μεγάλη ηλικία να θεωρηθεί ως φυσιολογική.

Η μέγιστη εκπνευστική ροή (PEF) όπως προαναφέρθηκε παρουσιάζει μία τάση ελάττωσης με την πρόοδο της ηλικίας. Πολύ σημαντική είναι η διαπίστωση ότι η ημερήσια μεταβλητότητα της PEF, μέτρηση που χρησιμοποιείται για την διάγνωση του άσθματος σε νέους ενήλικες, φαίνεται να είναι αυξημένη σε ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, ανεξάρτητα από την παρουσία άσθματος. Σε μελέτη 1223 υγιών μέσης ηλικίας 66 ετών, η μέση ημερήσια μεταβλητότητα της PEF ήταν 8.3% για τις γυναίκες και 9.2% για τους άνδρες<sup>31</sup>. Η απαντητικότητα του  $FEV_1$  σε εισπνεόμενα βρογχοδιασταλτικά δεν φαίνεται να ελαττώνεται με την πρόοδο της ηλικίας σε υγιή άτομα γεροντικής ηλικίας<sup>25</sup>, σε αντίθε-



Εικόνα 5. Μεταβολές στην μορφολογία της εκπνευστικής καμπύλης ροής-όγκου με την ηλικία. Η μικρότερη καμπύλη με την συνεχή διαγράμμιση προέρχεται από 10 άτομα μέσης ηλικίας 71 ετών, ενώ η μεγαλύτερη καμπύλη με διακεκομμένη διαγράμμιση από 10 άτομα μέσης ηλικίας 24 ετών. TLC: ολική πνευμονική χωρητικότητα, RV: υπολειπόμενος όγκος (από την βιβλιογραφική αναφορά 26).

ση με την δυσμενή επίδραση της ηλικίας στην λειτουργικότητα των β-υποδοχέων που έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ΧΑΠ.

Σε μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η επίπτωση της μη ειδικής βρογχικής υπεραντιδραστικότητας (πρόκληση με μεταχολίνη ή ισταμίνη) είναι πολύ μεγαλύτερη (περίπου 20%) σε άτομα γεροντικής ηλικίας >70 ετών από ότι σε νέους ενήλικες ή μεσήλικες (περίπου 8-10%). Ενδεχομένως να ευθύνεται συνδυασμός παραγόντων, όπως το σωρευτικό αποτέλεσμα του καπνίσματος και της επαγγελματικής και περιβαλλοντικής έκθεσης, η μείωση της πνευμονικής ελαστικότητας, η συνύπαρξη υποκλινικής συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας κλπ.

Δεν έχουν παρατηρηθεί ειδικές μεταβολές με την ηλικία στο εισπνευστικό τμήμα της καμπύλης ροής-όγκου, αν και η μέγιστη εισπνευστική ροή παρουσιάζει μία τάση ελάττωσης με την πρόοδο της ηλικίας. Η μέγιστη εισπνευστική ροή πρέπει να μετράται, ιδιαίτερα όταν συνταγογραφούνται εισπνεόμενα φάρμακα με συσκευές ξηράς κόνεως σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας, δεδομένου ότι η πνευμονική πρόσληψη της εισπνεόμενης ουσίας είναι εξαρτώμενη από την μέγιστη εισπνευστική ροή.

### Γ) Αντιστάσεις αεραγωγών

Δεν έχει παρατηρηθεί κάποια επίδραση της ηλικίας στις αντιστάσεις των αεραγωγών (Raw). Οι περιφερικοί αεραγωγοί συμμετέχουν ελάχιστα στην ολική αντίσταση και συνεπώς οι περιγραφείσες μεταβολές των περιφερικών αεραγωγών δεν έχουν ως αποτέλεσμα κάποια μεταβολή της αντίστασης των αεραγωγών<sup>5,6</sup>.

### Δ) Μέτρηση της ισχύος των αναπνευστικών μυών

Η δυσλειτουργία των αναπνευστικών μυών μπορεί να οδηγήσει σε υποαερισμό, διαταραχές της ανταλλαγής αερίων, δύσπνοια, μειωμένη ανοχή στην κόπωση και τελικά σε αναπνευστική ανεπάρκεια.

Η μυϊκή ισχύς των αναπνευστικών μυών μπορεί να μετρηθεί μη επεμβατικά με την μέτρηση της μέγιστης εισπνευστικής πίεσης (MIP) και της μέγιστης εκπνευστικής πίεσης (MEP) στο στόμα. Τιμές MIP άνω των 80 cmH<sub>2</sub>O (άνδρες) ή των 70 cmH<sub>2</sub>O (γυναίκες), ουσιαστικά αποκλείουν αδυναμία των αναπνευστικών μυών. Η πρόοδος της ηλικίας σχετίζεται με προοδευ-



τική ελάττωση των MIP και MEP. Έχει δειχθεί, σε μελέτη 4443 υγιών ηλικίας > 65 ετών, ότι τα προαναφερθέντα φυσιολογικά όρια της MIP είναι χαμηλότερα<sup>13</sup>. Οι σπυρομετρικές τιμές, οι δείκτες θρέψης (σωματικό βάρος, δείκτης σωματικής μάζας) και η ισχύς των περιφερικών σκελετικών μυών συσχετίζονται σημαντικά με τις MIP και MEP. Η επίδραση της θρέψης και της καρδιακής ανεπάρκειας στην ισχύ των αναπνευστικών μυών έχει αναφερθεί προηγουμένως.

Η με την ηλικία ελάττωση της μυϊκής ισχύος μπορεί να αποκτήσει κλινικά σημαντικό χαρακτήρα σε κλινικές καταστάσεις όπου υφίσταται επιπρόσθετο φορτίο στους αναπνευστικούς μύς, όπως σε πνευμονία (6) ή σε αριστερή καρδιακή ανεπάρκεια<sup>20,21</sup>.

### **Ε) Ανομοιογένεια κατανομής αερισμού - Σχέση αερισμού/αιμάτωσης (V/Q) - Μερική τάση αερίων αρτηριακού αίματος (PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>)**

Με την τεχνική των πολλαπλών αδρανών αερίων (multiple inert gas technique), έχει αποδειχθεί ότι σε μεγάλη ηλικία παρατηρείται αύξηση των λειτουργικών μονάδων με υψηλή σχέση V/Q (φυσιολογικός νεκρός χώρος) καθώς και αυτών με χαμηλή σχέση V/Q (shunt ή φλεβική πρόσμειξη)<sup>32,33</sup>.

Είναι γνωστό ότι, σε υψηλούς πνευμονικούς όγκους (κοντά στην TLC), οι λειτουργικές μονάδες των κατώτερων ζωνών των πνευμόνων (κοντά στο διάφραγμα σε όρθια θέση), δέχονται περισσότερο αερισμό και περισσότερη αιμάτωση, σε σύγκριση με τις λειτουργικές μονάδες των ανώτερων ζωνών (κορυφές πνευμόνων). Αυτές οι περιοχικές διαφορές στην κατανομή αερισμού και αιμάτωσης συνδυάζονται με τρόπο ώστε να προσφέρουν ιδανική ανταλλαγή αερίων. Σε χαμηλούς πνευμονικούς όγκους όμως (κοντά στον RV), οι λειτουργικές μονάδες των βάσεων κλείνουν και παύουν να αερίζονται και έτσι παρατηρείται κατάργηση ή και αναστροφή της προαναφερθείσας κατακόρυφης διαφοράς της κατανομής αερισμού, με αποτέλεσμα, σε όγκους κοντά στον RV, να έχουμε μεγαλύτερο αερισμό στις κορυφές και όχι στις βάσεις των πνευμόνων. Σε νέους και μεσήλικες υγιείς ανθρώπους, η αναστροφή αυτή της κατανομής αερισμού δεν παρατηρείται κατά την διάρκεια της ήρεμης αναπνοής (δηλαδή σε όγκους κοντά στην FRC). Σε υγιή άτομα όμως γεροντικής ηλικίας, στα οποία ο RV έχει αυξηθεί πε-

ρισσότερο από ότι έχει αυξηθεί η FRC (και έτσι ο RV είναι κοντά στην FRC), δυνατόν, κατά την διάρκεια της ήρεμης εκπνοής, μερικές λειτουργικές μονάδες στις κατώτερες πνευμονικές ζώνες να κλείσουν και να μην αερίζονται πριν από το τέλος της εκπνοής, και έτσι η φυσιολογική κατακόρυφη διαφορά κατανομής αερισμού (κορυφές < βάσεις) να αναστραφεί<sup>25</sup>. Αυτό δημιουργεί αύξηση της σχέσης V/Q στις κορυφές και ελάττωση της σχέσης V/Q στις βάσεις κατά την διάρκεια της ήρεμης αναπνοής, παρά το γεγονός ότι δεν υφίσταται πνευμονική νόσος.

Ως αποτέλεσμα αυτής της ανομοιογένειας της σχέσης αερισμού/αιμάτωσης και κυρίως της αύξησης των μονάδων με μειωμένη σχέση V/Q (κυρίως στις βάσεις των πνευμόνων, με πτωχό αερισμό σε σχέση με την αιμάτωσή τους και με ήρεμη αναπνοή, κοντά στα επίπεδα του αυξημένου, όπως προαναφέρθηκε, όγκου σύγκλισης) παρατηρείται μία ελάττωση της PaO<sub>2</sub> προοίους της ηλικίας<sup>32</sup>. Έχουν προταθεί διάφορες εξισώσεις της αναμενόμενης PaO<sub>2</sub> σε σχέση με την ηλικία, όμως η τρέχουσα άποψη<sup>34</sup> είναι ότι σε υγιείς > 65 ετών, η φυσιολογική PaO<sub>2</sub> είναι 80-85 mmHg (10.6-11.3 kPa).

Η κυψελδοαρτηριακή διαφορά οξυγόνου (AaDO<sub>2</sub>) αναμένεται να αυξηθεί με την ηλικία λόγω της αύξησης των λειτουργικών μονάδων με χαμηλή σχέση V/Q και της επακόλουθης αύξησης του όγκου σύγκλισης. Το εύρος των υψηλότερων φυσιολογικών τιμών σε κάθε ηλικία δίδεται από την εξίσωση (35): AaDO<sub>2</sub> (mmHg) = 1.4 + 0.43 x (ηλικία). Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν τιμές AaDO<sub>2</sub> σε άτομα μεγαλύτερα των 65 ετών, οι οποίες είναι σαφώς μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές των νέων ενηλίκων, 24 ± 10 mmHg (34) και 33 ± 5 mmHg<sup>36</sup>.

Η μερική τάση του CO<sub>2</sub> στο αρτηριακό αίμα (PaCO<sub>2</sub>) καθώς και το pH δεν επηρεάζονται και δεν μεταβάλλονται με την ηλικία.

### **ΣΤ) Διαχυτική ικανότητα πνευμόνων**

Η ηλικία συσχετίζεται με προοδευτική μείωση της διαχυτικής ικανότητας για το μονοξειδίο του άνθρακα (TL,CO), κυρίως μετά την ηλικία των 40 ετών, με επίσημο ρυθμό μείωσης κατά 0.2-0.32 ml/min/mmHg στους άνδρες και 0.06-0.18 ml/min/mmHg στις γυναίκες<sup>2,36</sup>.

Όπως προαναφέρθηκε, η επιπέδωση της εσωτερι-

κής επιφάνειας των κυψελίδων οδηγεί σε προοδευτική ελάττωση της κυψελιδοτριχοειδικής επιφάνειας (75 τ.μ. σε ηλικία 30 ετών, 60 τ.μ. σε ηλικία 70 ετών, μέση ελάττωση 0.27 τ.μ./έτος).

Άλλες αιτίες της σταδιακής ελάττωσης της διάχυσης είναι η ετερογένεια της σχέσης V/Q, η ελάττωση του αριθμού των πνευμονικών τριχοειδών και η μείωση του πνευμονικού τριχοειδικού όγκου αίματος<sup>36-39</sup>.

Αν και υπάρχει μεγάλη διακύμανση των μετρήσεων, έχει δειχθεί μία συσχέτιση της TL,CO με την ηλικία σε υγιείς ηλικίας 69-104 ετών (36) η οποία εκφράζεται με την εξίσωση:

$$TL,CO \text{ (ml/min/kPa)} = 126 - 0.9x(\text{ηλικία}).$$

## Z) Νευρικός έλεγχος της αναπνοής

Φυσιολογικά άτομα γεροντικής ηλικίας αναπνέουν σε συνθήκες ηρεμίας με τον ίδιο κατά λεπτόν ολικό αερισμό (VE) όπως και οι νεότεροι, όμως με μικρότερο όγκο αναπνοής και μεγαλύτερη αναπνευστική συχνότητα<sup>3</sup>.

Η γεροντική ηλικία έχει συσχετισθεί κατ'εξοχήν με σημαντική μείωση του μεγέθους της απάντησης του αερισμού στην υποξία και στην υπερχαπνία σε συνθήκες ηρεμίας. Σε μία πολύ ενδιαφέρουσα παλαιά μελέτη (40), συγκρίθηκαν οι απαντήσεις της αύξησης του αερισμού στην υποξία και την υπερχαπνία σε νέους άνδρες ηλικίας 22-30 ετών και αντίστοιχα σε άνδρες ηλικίας 64-73 ετών. Η αύξηση του αερισμού, ως απάντηση σε μία μείωση της κυψελιδικής PO<sub>2</sub> σε επίπεδα 40 mmHg, ήταν 40±5 (νέοι) και 10±1 l/min (γέροντες). Επιπλέον, η αύξηση του αερισμού, ως απάντηση σε μία άνοδο της PCO<sub>2</sub> μέχρι 55 mmHg, ήταν αντίστοιχα 3.4±0.5 και 2.0±0.2 l/min/mmHg. Εκτός από την απάντηση του αερισμού και η απάντηση της P<sub>0.1</sub> (δείκτης του μεγέθους της αναπνευστικής ώσης ή respiratory drive) στην υποξία και την υπερχαπνία ελαττώνεται κατά 50% περίπου σε άτομα γεροντικής ηλικίας (41).

Επίσης έχει δειχθεί ότι με την ηλικία ελαττώνεται η αντίληψη επιπρόσθετων φορτίων είτε αντιστάσεως είτε ελαστικότητας καθώς και η αντίληψη της βρογχοσύσπασης που προκαλείται από μεταχολίνη (5).

Όλα αυτά τα ευρήματα αποκαλύπτουν μία σχετιζόμενη με την πρόοδο της ηλικίας φθίνουσα ικανότητα κεντρικής επεξεργασίας της πληροφορίας που λαμβάνεται από χημειο- και μηχανο-υποδοχείς και δη-

μιουργίας αντίστοιχου μεγέθους νευρικής δραστηριότητας, με τελικό και σημαντικό αποτέλεσμα για την ζωή του ασθενούς, την μερική απώλεια σπουδαίων προστατευτικών μηχανισμών, όπως είναι αυτός της δύσπνοιας.

## H) Συμπεριφορά του αναπνευστικού συστήματος στην άσκηση

Η μέγιστη αερόβια ικανότητα, όπως αυτή εκτιμάται από την μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου (VO<sub>2</sub>max), φθάνει στην μέγιστη τιμή της στην ηλικία των 20-30 ετών και μετά ακολουθεί μία φθίνουσα πορεία, μειούμενη περίπου κατά 10% ανά 10ετία<sup>2</sup>. Σύμφωνα με την εξίσωση του Fick, η VO<sub>2</sub> εξαρτάται από την καρδιακή παροχή και την ιστική χρησιμοποίηση του O<sub>2</sub> [VO<sub>2</sub> = (Ca-Cv)O<sub>2</sub> x Q]. Ο κύριος παράγον που ευθύνεται για την ελάττωση της VO<sub>2</sub>max με την ηλικία είναι η ελάττωση της καρδιακής παροχής (λόγω ελάττωσης της μέγιστης καρδιακής συχνότητας και αδυναμίας αύξησης του όγκου παλμού πέραν ενός ορίου) και δευτερευόντως, η μειωμένη εξαγωγή και χρήση του οξυγόνου στους περιφερικούς σκελετικούς μύς, λόγω δομικών μεταβολών που συμβαίνουν στους μύς με την ηλικία και έχουν ήδη προαναφερθεί (ελάττωση της μυϊκής μάζας, μείωση του αριθμού των μυϊκών ινών τύπου II, μεταβολές της λειτουργικότητας των νευρομυϊκών συνάψεων, διαταραχή των αντλιών ιόντων ασβεστίου, μειωμένη σύνθεση της μυοσίνης, προοδευτική απώλεια της λειτουργικότητας της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας) και οι οποίες επιτείνονται και από άλλες καταστάσεις, όπως η υποθρεψία ή η μειωμένη κινητικότητα και η κακή φυσική κατάσταση των γερόντων.

Αντίθετα με ότι προαναφέρθηκε ότι συμβαίνει σε συνθήκες ηρεμίας, σε άτομα γεροντικής ηλικίας έχει παρατηρηθεί μία αύξηση του μεγέθους της απάντησης αερισμού στο CO<sub>2</sub> κατά την διάρκεια άσκησης. Σε 224 εξετασθέντες ηλικίας 56-85 ετών βρέθηκε ότι σε δεδομένο επίπεδο παραγωγής CO<sub>2</sub>, η απάντηση του αερισμού (VE/VCO<sub>2</sub>) αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας χωρίς αυτή η αύξηση να δικαιολογείται από πιθανό οξυαιμοσφαιρινικό αποκορεσμό ή μεταβολική οξέωση<sup>42</sup>. Η αυξημένη αυτή απάντηση αερισμού πιθανότατα μπορεί να αποδοθεί στο αυξημένο VD/VT των ατόμων μεγάλης ηλικίας (κάτι που επιβεβαιώνεται από την ανεύρεση αυξημένης της διαφοράς μεταξύ αρτηριακής και τελοεκπνευστικής PCO<sub>2</sub>). Οι αυξημένες

ανάγκες σε αερισμό κατά την διάρκεια της άσκησης μεγαλύτερη δύσπνοια.  
έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένο έργο αναπνοής και

Πίνακας 3. Επίδραση του γήρατος στις δοκιμασίες αναπνευστικής λειτουργίας

Στατικοί όγκοι	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Αμετάβλητη TLC</li> <li>2. <math>\uparrow</math>RV, <math>\uparrow</math>RV/TLC (παγίδευση αέρα)</li> <li>3. <math>\downarrow</math>VC (=TLC-RV)</li> <li>4. Μικρή <math>\uparrow</math>FRC (υπερδιάταση)</li> <li>5. <math>\uparrow</math>CV (closing volume)</li> <li>6. Αμετάβλητος <math>V_T</math></li> <li>7. Μικρή <math>\downarrow</math>IC (=TLC-FRC)</li> <li>8. Μικρή <math>\downarrow</math>IRV (=TLC-[FRC+<math>V_T</math>])</li> <li>9. <math>\downarrow</math>ERV (=FRC-RV)</li> </ol>
Σπιρομετρία-Flow/volume	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\downarrow</math>FEV<sub>1</sub></li> <li>2. Μικρή <math>\downarrow</math>FVC</li> <li>3. <math>\downarrow</math>FEV<sub>1</sub>/FVC</li> <li>4. <math>\downarrow</math>FEF<sub>25-75%</sub>, <math>\downarrow</math>FEF<sub>75%</sub> (scooping)</li> <li>5. Μικρή <math>\downarrow</math>PEF</li> <li>6. <math>\uparrow</math>ημερήσιας διακύμανσης της PEF</li> <li>7. Αμετάβλητη αναστρεψιμότητα (βρογχοδιαστολή)</li> <li>8. <math>\uparrow</math>μη ειδικής βρογχικής υπεραντιδραστικότητας</li> <li>9. Αμετάβλητη εισπνευστική καμπύλη ροής/όγκου</li> </ol>
Αντιστάσεις αεραγωγών	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Αμετάβλητη Raw</li> </ol>
Ισχύς αναπνευστικών μυών	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\downarrow</math>MIP, <math>\downarrow</math>MEP</li> <li>2. <math>\downarrow</math>μέγιστης διαδιαφραγματικής πίεσης (<math>P_{di}</math>max)</li> </ol>
Σχέση V/Q-Ανταλλαγή αερίων	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\uparrow</math>λειτουργικών μονάδων με υψηλό V/Q (dead space)</li> <li>2. <math>\uparrow</math>λειτουργικών μονάδων με χαμηλό V/Q (shunt)</li> <li>3. Ανομοιογένεια αερισμού &amp; V/Q και σε κ.φ. αναπνοή</li> <li>4. <math>\downarrow</math>PaO<sub>2</sub></li> <li>5. <math>\uparrow</math>κυψελιδοτριχοειδικής διαφοράς O<sub>2</sub> (AaDO<sub>2</sub>)</li> <li>6. Αμετάβλητη PaCO<sub>2</sub></li> <li>7. Αμετάβλητο pH</li> </ol>
Διαχντική ικανότητα πνευμόνων	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\downarrow</math>DLCO</li> </ol>
Έλεγχος αναπνοής (σε ηρεμία)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\downarrow</math>απόκρισης αερισμού-P<sub>0.1</sub> σε ισοκαπνική υποξία</li> <li>2. <math>\downarrow</math>απόκρισης αερισμού-P<sub>0.1</sub> σε υπεροξική υπερκαπνία</li> <li>3. <math>\downarrow</math>αντίληψης επιπρόσθετου ελαστικού φορτίου</li> <li>4. <math>\downarrow</math>αντίληψης επιπρόσθετου φορτίου αντιστάσεων</li> <li>5. <math>\downarrow</math>αντίληψης βρογχοσύσπασης από μεταχολίνη</li> </ol>
Άσκηση	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\downarrow</math>αερόβιας ικανότητας (VO<sub>2</sub>max)</li> <li>2. <math>\uparrow</math>απόκρισης αερισμού στο CO<sub>2</sub> (<math>\uparrow</math>V<sub>E</sub>/VCO<sub>2</sub>)</li> <li>3. <math>\uparrow</math>έργου αναπνοής &amp; δύσπνοιας</li> </ol>
Ύπνος	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\uparrow</math>συχνότητας διαταραχών αναπνοής στον ύπνο</li> <li>2. <math>\downarrow</math>αναπνευστικής προσπάθειας για υπερνίκηση της απόφραξης στην διάρκεια της άπνοιας</li> </ol>

### Θ) Διαταραχές της αναπνοής στον ύπνο

Η συχνότητα ανεύρεσης διαταραχών αναπνοής κατά την διάρκεια του ύπνου (άπνοιες, υπόπνοιες, σύνδρομο αυξημένης αντίστασης ανώτερων αεραγωγών) αυξάνεται θεαματικά σε άτομα γεροντικής ηλικίας. Χρησιμοποιώντας ως διαχωριστικό όριο ένα δείκτη άπνοιών-υπόπνοιών (AHI, apnea-hypopnea index)  $\geq 15$  επεισόδια/ώρα, η συχνότητα των διαφόρων υπνοαπνοϊκών συνδρόμων σε μεσήλικες υπολογίζεται σε 4-9% του γενικού πληθυσμού<sup>43</sup>, ενώ αντίθετα, σε άτομα ηλικίας άνω των 70 ετών, έχει βρεθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 24-75%<sup>44,45</sup>, επηρεάζοντας δυσμενώς την εγχεφα-

λική<sup>44</sup> και την καρδιακή λειτουργία. Η αναπνευστική προσπάθεια (όπως αυτή εκτιμάται, είτε με μέτρηση οισοφάγιας πίεσης είτε με την ποιοτική εκτίμηση των κινήσεων του θωρακικού και κοιλιακού τοιχώματος) που καταβάλλεται για την υπερνίκηση της απόφραξης των ανώτερων αεραγωγών κατά την διάρκεια της άπνοιας είναι ελαττωμένη σε άτομα γεροντικής ηλικίας.

Οι μεταβολές των παραμέτρων της αναπνευστικής λειτουργίας στον γηράσκοντα πνεύμονα φαίνονται στον Πίνακα 3.

### SUMMARY

#### *The ageing lung: The influence of ageing on pulmonary function*

*Kosmas E., Koulouris N.*

*During the first 25 years of life, the lungs and the respiratory system undergo a phase of growth and maturation until maximal function is reached. Throughout the remainder of life, aging is associated with a progressive decline in lung performance. Normal aging of the respiratory system is attributed to structural changes of the chest wall (rib calcification, osteoporosis, vertebral fractures, narrowing of intervertebral disk spaces, increased dorsal kyphosis, "barrel chest" etc ), of the lung parenchyma (dilatation of alveoli, enlargement of airspaces, decrease in gas-exchange surface area and loss of supporting tissue for peripheral airways) and of the respiratory muscles (decrease in muscle mass, decrease in the number of muscle fibres type II and motor units, alterations in neuromuscular junctions, decreased synthesis of myosin and decline in mitochondrial respiratory chain function). Age-related structural changes result in various functional alterations, such as increased chest wall stiffness, decreased lung elastic recoil and increased lung compliance, gas-trapping, hyperinflation and reduction of respiratory muscle strength. Furthermore, forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>), vital capacity and expiratory flows at low lung volumes decline with a characteristic pattern in the flow-volume loop, indicating small airway dysfunction. Low ventilation-perfusion ratio ( $V_A/Q$ ) zones emerge as a result of premature closing of dependent airways and lead to an increase in  $V_A/Q$  heterogeneity. Carbon monoxide diffusion decreases with age, reflecting a loss in surface area. Despite these extensive functional derangements, the respiratory system remains capable of maintaining adequate gas exchange at rest and on exertion, during the entire human lifespan, with only a mild decrease in arterial oxygen tension (PaO<sub>2</sub>) but without change in arterial carbon dioxide tension (PaCO<sub>2</sub>). However, aging tends to diminish the reserve of the respiratory system in cases of acute disease. In addition, the age-related diminished physical activity and the consequent deconditioning, the decreased sensitivity of respiratory centres to hypoxia/hypercapnia and the diminished ability to perceive added resistive and elastic loads, all may result in a blunted ventilatory response under various life-threatening clinical conditions (such as acute respiratory failure, heart failure and hydrostatic pulmonary edema, infection or bronchoconstriction) and therefore, lesser awareness of the disease and delayed diagnosis with possibly hazardous consequences. **Pneumon 2000, 13 (2): 108-122***

**Key words:** Age - Ageing - Pulmonary function, Pulmonary physiology.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bates DV, Christie RV. Effects of ageing on respiratory function in man. In: Wolstenholme EV, Cameron MF, eds. Ciba Foundation Colloquia on Ageing: General Aspects. Boston MA, Little Brown, 1955, pp: 58-75.
2. Murray JF. Aging. In: Murray JF, ed. The Normal Lung. Philadelphia PA, WB Saunders, 1986, pp: 339-360.
3. Krumpel PE, Knudson RJ, Parsons G, Reiser K. The aging respiratory system. *Clin Geriatr Med* 1985, 1: 143-175.
4. Turner J, Mead J, Wohl M. Elasticity of human lungs in relation to age. *J Appl Physiol* 1968, 25: 664-671.
5. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 1999, 13: 197-205.
6. Crapo RO. The aging lung. In: Mahler DA, ed. Pulmonary Disease in the Elderly Patient. Vol. 63. New York, Marcel Dekker, 1993, pp: 1-21.
7. Teramoto S, Fukuchi Y, Uejima Y, Teramoto K, Oka T, Orimo H. A novel model of senile lung: senescence-accelerated mouse (SAM). *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150: 238-244.
8. Verbeken E, Cauberghs M, Mertens I. The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lungs. I: Structural aspects. *Chest* 1992, 101: 793-799.
9. Gunby MC, Morley JE. Epidemiology of bone loss with aging. *Clin Geriatr Med* 1994, 10: 557-571.
10. Edge J, Millard F, Reid L. The radiographic appearance of the chest in persons of advanced age. *Br J Radiol* 1984, 37: 769-774.
11. Basse EJ, Harris UJ. Normal values for handgrip strength in 920 men and women aged over 65 years and longitudinal changes over 4 years in 620 survivors. *Clin Sci* 1993, 84: 331-337.
12. Tolep K, Kelsen S. Effect of aging on respiratory skeletal muscles. *Clin Chest Med* 1993, 14: 363-378.
13. Enright PL, Kronmal RA, Manolio TA, et al. Respiratory muscle strength in the elderly: correlates and reference values. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149: 430-438.
14. Polkey MI, Harris ML, Hughes PD. The contractile properties of the elderly human diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 155: 1560-1564.
15. Tolep K, Higgins N, Muza S, et al. Comparison of diaphragm strength between healthy adult elderly and young men. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152: 677-682.
16. Arora NS, Rochester DF. Effect of body weight and muscularity on human diaphragm muscle mass, thickness and area. *J Appl Physiol* 1982, 52: 64-70.
17. Arora NS, Rochester DF. Respiratory muscle strength and maximal voluntary ventilation in undernourished patients. *Am Rev Respir Dis* 1982, 126: 5-8.
18. Wilson DO, Rogers RM, Hoffman RM. Nutrition and chronic lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1985, 132: 1347-1365.
19. Mancini D, Henson D, LaManca J, et al. Respiratory muscle function and dyspnoea in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1992, 86: 909-918.
20. Nishimura Y, Maeda H, Tanaka K, et al. Respiratory muscle strength and hemodynamics in chronic heart failure. *Chest* 1994, 105: 355-359.
21. Evans S, Watson L, Hawkins M, et al. Respiratory muscle strength in chronic heart failure. *Thorax* 1995, 50: 625-628.
22. Stassijns G, Lysens R, Decramer M. Peripheral and respiratory muscles in chronic heart failure. *Eur Respir J* 1996, 9: 2161-2167.
23. Brown L. Respiratory dysfunction in Parkinson's disease. *Clin Chest Med* 1994, 15: 715-727.
24. Vingerhoets F, Bogousslavsky J. Respiratory dysfunction in stroke. *Clin Chest Med* 1994, 15: 729-737.
25. Enright PL, Rodarte JR. Physiology of the aging lung. In: *Asthma in the Elderly*, edited by Barbee RA, Bloom JW, Marcel Dekker Inc., New York 1997, pp: 69-92
26. Knudson RJ, Slatin RC, Lebowitz MD, et al. The maximal expiratory flow-volume curve: normal standards, variability, effects of age. *Am Rev Respir Dis* 1976, 113: 587-599.
27. Brandstetter RD, Kazemi H. Aging and the respiratory system. *Med Clin North Am* 1983, 67: 419-431.
28. Milne JS, Williamson J. Respiratory function tests in older people. *Clin Sci* 1972, 42: 371-381.
29. DuWayne Schmidt C, Dickman ML, Gardner RM, et al. Spirometric standards for healthy elderly men and women: 532 subjects, ages 55 through 94 years. *Am Rev Respir Dis* 1973, 108: 933-939.
30. Fowler RW, Pluck RA, Hetzel MR. Maximal expiratory flow-volume curves in Londoners aged 60 yrs and over. *Thorax* 1987, 42: 173-182.
31. Enright P, Burchette R, Peters J, et al. Peak flow liability: association with asthma and spirometry in an older cohort. *Chest* 1997, 112: 895-901.
32. Wagner P, Laravuso R, Uhl R, West J. Continuous distribution of ventilation-perfusion ratios in normal subjects breathing air and 100% O<sub>2</sub>. *J Clin Invest* 1974, 54:

- 54-68
33. Wagner PD, Saltzman HA, West JB. Measurement of continuous distributions of ventilation-perfusion ratios: theory. *J Appl Physiol* 1974, 36: 588-599.
  34. Delclaux B, Orsel B, Housset B, et al. Arterial blood gases in elderly persons with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur Respir J* 1994, 7: 856-861.
  35. Sorbini CA, Grassi V, Solinas E, et al. Arterial oxygen tension in relation to age in healthy subjects. *Respiration* 1968, 25: 3-13.
  36. Guenard H, Marthan R. Pulmonary gas exchange in elderly subjects. *Eur Respir J* 1996, 9: 2573-2577.
  37. Thurlbeck W, Angus G. Growth and aging of the normal human lung. *Chest* 1975, 67: 3-7.
  38. Verbeken E, Caubergs M, Mertens I. The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lung. *Chest* 1992, 101: 793-799.
  39. Butler C, Kleinerman J. Capillary density: alveolar diameter, a morphometric approach to ventilation and perfusion. *Am Rev Respir Dis* 1970, 102: 886-894.
  40. Kronenberg R, Drage G. Attenuation of the ventilatory and heart rate responses to hypoxia and hypercapnia with aging in normal man. *J Clin Invest* 1973, 52: 1812-1819.
  41. Peterson DD, Pack AI, Silage DA, Fishman AP. Effects of aging on ventilatory and occlusion pressure responses to hypoxia and hypercapnia. *Am Rev Respir Dis* 1981, 124: 387-391.
  42. Poulin MJ, Cunningham DA, Paterson DH, et al. Ventilatory response to exercise in men and women 55 to 86 years of age. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149: 408-415.
  43. Young T, Palta M, Dempsey J, et al. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993, 328: 1230-1235.
  44. Dealberto M, Pajot N, Courbon D, et al. Breathing disorders during sleep and cognitive performance in an older community sample: the EVA study. *J Am Geriatr Soc* 1996, 44: 1287-1294.
  45. Ancoli-Israel S, Coy T. Are breathing disturbances in elderly equivalent to sleep apnea syndrome? *Sleep* 1994, 17: 77-83.

## Η Συντακτική Επιτροπή του περιοδικού με μεγάλη χαρά σας κοινοποιεί την ανακοίνωση της Γραμματείας του ΙΑΤΡΟΤΕΚ

### Ανακοίνωση

Η Επιτροπή του ΙΑΤΡΟΤΕΚ ολοκλήρωσε το έργο της αξιολόγησης των 20 βιοϊατρικών περιοδικών που ανταποκρίθηκαν στη σχετική πρόσκληση και υπέβαλαν ανάλογη αίτηση αξιολόγησης μέχρι τις 29 Σεπτεμβρίου 1999 και έθεσε τις εκθέσεις αξιολόγησης υπόψη του Σώματος των Ακαδημαϊκών και Ομοτίμων Καθηγητών της Ιατρικής, που απαρτίζεται από τους κ.κ. Ν. Μασσανιώτη (πρόεδρο), Γ. Δαϊκο, Γρ. Σκαλκέα, Κ. Στεφανή, Κ. Τούντα και Δ. Τριχόπουλο, από το οποίο ζητήθηκε η τελική έγκριση.

Με βάση τη διαδικασία αυτή, στον κατάλογο των αναγνωρισμένων Ελληνικών βιοϊατρικών περιοδικών, τα οποία αποδελτιώνονται άμεσα και διατίθενται από τη βάση του ΙΑΤΡΟΤΕΚ ([www.mednet.gr/iatrotek](http://www.mednet.gr/iatrotek)), περιλαμβάνονται τα εξής:

1. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής (Ιατρική Εταιρεία Αθηνών)
2. Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας (Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρεία)
3. Ιατρική (Εταιρεία Ιατρικών Σπουδών)
4. Παιδιατρική (Ελληνική Παιδιατρική Εταιρεία)
5. Πνεύμων (Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία - Ελληνική Βρογχολογική Εταιρεία)

Περιοδικά, τα οποία θα υποβάλουν στο μέλλον αίτηση είτε για αρχική αξιολόγηση είτε για επαναξιολόγηση μετά από τροποποιήσεις που έγιναν σύμφωνα με υποδείξεις της Επιτροπής, θα αξιολογούνται από την ΙΑΤΡΟΤΕΚ, με την ίδια διαδικασία, μετά το τέλος κάθε ημερολογιακού εξαμήνου.

**Ιούνιος 2000**

# Συγκριτική οικονομική αξιολόγηση της δοσιμετρικής συσκευής (Metered Dose Inhaler, Mdi) και της ενεργοποιούμενης με την αναπνοή δοσιμετρικής συσκευής (Breath Actuated Inhaler, BAI) στη θεραπεία του άσθματος

Γ. Κυριόπουλος<sup>1</sup>  
Α. Γρηγορίου<sup>1</sup>  
Γ. Μαθιουδάκης<sup>2</sup>  
Μ. Γείτονα<sup>1</sup>  
Γ. Καραλής<sup>1</sup>  
Γ. Ροτζιώκος<sup>2</sup>  
Ε. Γεωργούση<sup>1</sup>  
Α. Δεδούση<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας - Τομέας Οικονομικών Υγείας, <sup>2</sup>Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Νικαίας Πειραιώς, Πνευμονολογική Κλινική.

**Λέξεις κλειδιά:** άσθμα, δοσιμετρική συσκευή αερολύματος, δοσιμετρική συσκευή ξηράς κόνεως, ενεργοποιούμενη με την αναπνοή δοσιμετρική συσκευή, κόστος θεραπείας

Αλληλογραφία:  
Γιάννης Κυριόπουλος, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας - Τομέας Οικονομικών Υγείας, Λεωφ. Αλεξάνδρας 196, τκ.: 11521 Αθήνα, τηλ.: 6435328, 6426380, FAX 6449571

Η εργασία παρελήφθη στις 13/10/1998 και εγκρίθηκε προς δημοσίευση στις 18/5/2000.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Η χορήγηση β2-διεγερτών και γλυκοκορτικοειδών, συνήθως με εισπνοές, μέσω δοσιμετρικών συσκευών απελευθερώσεως αερολύματος (MDI) ή ξηράς κόνεως (DPI) αποτελούν ουσιώδη συστατικά στη θεραπευτική του βρογχικού άσθματος. Επειδή η συμμόρφωση των ασθενών (ιδίως των ανήλικων και υπερήλικων) στη θεραπεία με δοσιμετρικές συσκευές είναι μικρή, αναζητούνται άλλες τεχνικές χορηγήσεως εισπνοών, μεταξύ των οποίων η πρόσφατα παρουσιασθείσα συσκευή που ενεργοποιείται με την αναπνοή (breath actuated metered dose inhaler, BAI). Διαπιστώσαμε ότι οι "αποτυχίες" στη θεραπεία λόγω κακής χρήσεως των δοσιμετρικών συσκευών ανέρχονται στο 39% προκειμένου περί συσκευών MDI και 4% προκειμένου περί συσκευών BAI. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας συμπεραίνουμε ότι η διαφορά κόστους μεταξύ των δύο συσκευών είναι σημαντική, όταν οι συσκευές χρησιμοποιούνται για να απελευθερώσουν σαλβουταμόλη και χρησιμοποιούνται από ασθενείς τόσο στην ελεύθερη αγορά υπηρεσιών υγείας όσο και στο Δημόσιο σύστημα υγείας (ΕΣΥ-ΙΚΑ), ενώ η συσκευή BAI είναι φθηνότερη της συσκευής MDI, όταν χρησιμοποιείται για τη χορήγηση μεκλομεθαζόνης και χρησιμοποιούνται από ασθενείς, ανεξάρτητα της ασφαλιστικής τους σχέσης. *Πνεύμων 2000, 13 (2): 123-136*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δράση των β2-διεγερτών και των γλυκοκορτικοειδών στη θεραπευτική αντιμετώπιση του βρογχικού άσθματος είναι γνωστή. Χορηγού-

νται -συνήθως- υπό μορφή εισπνεομένου αερολύματος ή ξηράς κόνεως μέσω ειδικών συσκευών, όπως η δοσιμετρική συσκευή αερολύματος (metered dose inhaler, MDI), η ειδική συσκευή εισπνοής ξηράς κόνεως (dry powder inhaler, DPI), και η ειδική συσκευή, ενεργοποιούμενη με την αναπνοή (breath actuated inhaler, BAI). Έχει από μακρού επισημανθεί ότι ένας μεγάλος αριθμός ασθενών (περίπου 30-68%) αδυνατεί να χρησιμοποιήσει ορθά τις δοσιμετρικές συσκευές εισπνοών, MDI<sup>1-10</sup>, γεγονός το οποίο επηρεάζει σημαντικά τη βιοδιαθεσιμότητα και την αποτελεσματικότητα των χορηγούμενων φαρμάκων με τη μέθοδο αυτή (πίνακας 1). Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές σε ηλικιωμένους<sup>7</sup> και παιδιά<sup>11</sup> ή σε ασθενείς που δεν έχουν υποστεί επαρκή εκπαίδευση χρήσεως από το νοσηλευτικό προσωπικό<sup>12</sup>.

Σε απάντηση του μείζονος αυτού προβλήματος δηλαδή της αποδοτικής χρησιμοποίησης δοσιμετρικής συσκευής παροχής του φαρμάκου δι' εισπνοών, έχουν σχεδιασθεί και εισαχθεί στην αγορά εναλλακτικές λύσεις, μεταξύ των οποίων η συσκευή Turbuhaler® εισπνοής ξηράς κόνεως και η συσκευή Autohaler®. Η τελευταία "οπλίζεται" με τη μετακίνηση ενός μοχλού, με αποτέλεσμα τη διάθεση της ακριβούς, προς χορήγηση, δόσης στο κάνιστρο και κατόπιν ενεργοποιείται με την έναρξη της εισπνοής. Έχει διαπιστωθεί ότι οι συσκευές του τύπου αυτού είναι ευχερέστερα αποδεκτές από τους ασθενείς, επάγουν τη συμμόρφωση και προσαρμογή τους στη θεραπεία και συγκεντρώνουν την προτίμησή τους<sup>13-15</sup>, ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται καλύτερη διανομή και εναπόθεση του φαρμάκου στο τραχειοβρογχικό δένδρο<sup>16-18</sup>.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι η συγκριτική οικονομική αξιολόγηση δύο συσκευών διαφορετικής τεχνολογίας χορηγήσεως φαρμακευτικών ουσιών δι' εισπνοών, συγκεκριμένα της σαλβουταμόλης και της διπροπιονικής μπεκλομεθαζόνης, μέσω συσκευής MDI ή BAI. Η μελέτη αυτή δεν υπεισέρχεται στο τμήμα εκείνο της οικονομικής αποτίμησης που μπορεί να προκύψει από διαφορετικές στην αποτελεσματικότητα ή την έκταση των ανεπιθύμητων ενεργειών, δεδομένου ότι πρόκειται για τις ίδιες ουσίες, οι οποίες χορηγήθηκαν με συσκευές διαφορετικής τεχνολογίας.

## ΥΛΙΚΟ

Για καθαρά πρακτικούς λόγους, θεωρήθηκε ότι στην εργασία αυτή εντάχθηκαν 100 ασθενείς με βρογχικό άσθμα, οι οποίοι παρακολούθηθηκαν επί διάστημα ενός μηνός, στη διάρκεια του οποίου θα ήταν δυνατός ο έλεγχος των συμπτωμάτων ή η ενδεχομένη εμφάνιση δυσχερειών χρήσης της συσκευής και, ως εκ τούτου, ο βαθμός συμμορφώσεώς τους.

Η εκτίμηση των οικονομικών παραμέτρων, βασίστηκε στην αναγνώριση τριών υποδειγμάτων ιατροφαρμακευτικής περιθάλψεως:

Το πρώτο υπόδειγμα (υπόδειγμα ΕΑ - ελεύθερη αγορά υγείας) λαμβάνει ως υπόθεση τις τιμές αγοράς και ο υπολογισμός του κόστους βασίζεται στις πραγματικές αγοραίες συνθήκες και στις τιμές υπηρεσιών υγείας, οι οποίες έχουν διαμορφωθεί στην ευρύτερη περιοχή της πρωτεύουσας, όπου το κόστος μιας ιατρικής επίσκεψης εκτιμήθηκε σε 10.000 δραχ.

Στο δεύτερο υπόδειγμα (υπόδειγμα ΕΣΥ - Εξωτε-

Πίνακας 1. Εκτίμηση Ποσοστών Συμμόρφωσης με Δοσιμετρική Συσκευή Εισπνοών (MDI) και Ειδική Συσκευή Ενεργοποιούμενη με την Εισπνοή (BAI)

Συγγραφείς	Αριθμός Ασθενών	MDI Συμμόρφωση		Αριθμός Ασθενών	BAI Συμμόρφωση	
	N	N	%		N	%
Larsen et al (1993)	12	5	0,42			
Chapman et al (1993)	40	28	0,70	40	36	0,90
Fergusson et al (1991)				156	151	0,97
Marshik et al (1995)				12	12	1,00
Newman et al (1991)	18	10	0,56			
Μέσος Σταθμικός Όρος	70	43	0,61	208	199	0,96



ρικά Ιατρεία ΕΣΥ), η κοστολόγηση της ιατροφαρμακευτικής φροντίδας προκύπτει από τις τιμές, οι οποίες διαμορφώνονται στον ευρύτερο δημόσιο τομέα και στους οργανισμούς κοινωνικής ασφάλισης, οι οποίοι δεν διαθέτουν ίδιες υπηρεσίες και χρησιμοποιούν τα εξωτερικά ιατρεία του ΕΣΥ. Αυτές υπολογίζονται με βάση τα διαθέσιμα απολογιστικά στοιχεία στο Εθνικό Σύστημα Υγείας και, ειδικότερα, στα δημόσια νοσηλευτικά ιδρύματα και αφορούν την περίθαλψη των ασφαλισμένων στον ΟΓΑ, των δημοσίων υπαλλήλων και άλλων ασφαλιστικών φορέων. Το κόστος επίσκεψης στα εξωτερικά Ιατρεία του ΕΣΥ, όπως φαίνεται στον πίνακα 2, υπολογίστηκε με την αναπροσαρμογή του μέσου ετήσιου αριθμού επισκέψεων που αναλογούν σε κάθε ιατρό ο οποίος απασχολείται στα Νοσοκομεία του ΕΣΥ, έτσι ώστε να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η στελέχωση των εξωτερικών ιατρείων αποτελεί μέρος της εργασίας ενός Νοσοκομειακού Ιατρού. Το μέρος αυτό θεωρήθηκε ότι αποτελεί το 20% της πλήρους απασχόλησης ενός Επιμελητή ΕΣΥ και ότι αμοιβάται κατ'αναλογία. Ακολούθως υπολογίστηκε η μέση ετήσια επιβάρυνση του ΕΣΥ από την απασχόληση ενός Επιμελητού. Επιπλέον, η ανάλυση των απολογισμών των Νοσοκομείων του ΕΣΥ για το έτος 1995 (στοιχεία από το Νοσοκομείο Σωτηρία) έδειξε ότι οι συνολικές αποδοχές του ιατρικού προσωπικού αποτε-

λούν το 16% έως 27% περίπου της συνολικής δαπάνης των νοσοκομείων για μισθούς, λειτουργικά έξοδα και προμήθειες. Η διακύμανση αυτή, σχετίζεται με το είδος και το μέγεθος του Νοσοκομείου, την πυκνότητα ιατρικού προσωπικού και την τεχνολογία που έχει επενδυθεί. Στην παρούσα μελέτη, θεωρήθηκε ότι το σύνολο των αμοιβών του ιατρικού προσωπικού αποτελεί το 20% των συνολικών εξόδων. Έτσι, το συνολικό κόστος μίας επίσκεψης προέκυψε με τον πολλαπλασιασμό του κόστους εργασίας ανά επίσκεψη ενός Επιμελητού με το συντελεστή 5.0, πρακτική η οποία ακολουθείται συνήθως<sup>19</sup>. Σημειώνεται ότι οι απολογισμοί των νοσοκομείων έχουν συνταχθεί με τρόπο που να επιτρέπει λογιστική και όχι οικονομική ανάλυση και συνεπώς δεν καταγράφουν όσα στοιχεία κόστους δεν προϋποθέτουν δαπάνη (πίνακας 2).

Στο τρίτο υπόδειγμα (υπόδειγμα ΙΚΑ), με ανάλογη προσέγγιση, αναφέρεται στις τιμές οι οποίες διαμορφώνονται στο ΙΚΑ. Κατ'αρχήν, το κόστος της φαρμακευτικής φροντίδας εκτιμήθηκε με βάση τη λιανική τιμή κάθε προϊόντος στη συσκευασία στην οποία κυκλοφορεί, τον αριθμό των εμπειροχόμενων δόσεων και την ενδεδειγμένη ημερήσια δοσολογία. Το κόστος της επικουρικής φαρμακευτικής αντιμετώπισης εκτιμήθηκε με ανάλογη μεθοδολογική προσέγγιση. Η εκτίμηση του κόστους επίσκεψης στα πολυιατρεία του ΙΚΑ,

*Πίνακας 2. Εκτίμηση Κόστους Επίσκεψης στα Εξωτερικά Ιατρεία Νοσοκομείων του ΕΣΥ και στα Πολυιατρεία του ΙΚΑ*  
*Εξωτερικά Ιατρεία ΕΣΥ*

Ετήσιος αριθμός επισκέψεων στα εξωτερικά ιατρεία ΕΣΥ (1995)	11.906.933
Συνολικός αριθμός ιατρών που απασχολούνται στα νοσοκομεία του ΕΣΥ (1995)	9.350
Ετήσιος αριθμός επισκέψεων που αναλογούν σε κάθε γιατρό	1.273
Μέσο ετήσιο κόστος εργασίας Επιμελητού Α του ΕΣΥ (περιλαμβάνει εργοδοτικές εισφορές)	8.474.000
Μέσο ετήσιο κόστος εργασίας Επιμελητού Α στα εξωτερικά ιατρεία (1 ιατρείο / εβδομάδα)	1.694.800
Κόστος αμοιβής εργασίας Επιμελητού Α του ΕΣΥ ανά επίσκεψη στα εξωτερικά ιατρεία	1.331
Συνολικό κόστος ανά επίσκεψη (συντελεστής αναγωγής 5.0)	6.655

*Πολυιατρεία ΙΚΑ*

Ετήσιος αριθμός επισκέψεων σε ιατρούς του ΙΚΑ (1995)	23.506.485
Συνολικός αριθμός ιατρών που υπηρετούν στο ΙΚΑ (1993)	7.243
Ετήσιος αριθμός επισκέψεων ανά ιατρό	3.245
Μέσο ετήσιο κόστος αμοιβής μόνιμου ιατρού ΙΚΑ	6.206.536
Κόστος αμοιβής ιατρού ΙΚΑ ανά επίσκεψη	1.913
Συνολικό κόστος ανά επίσκεψη (συντελεστής αναγωγής 2.5)	4782,5

όπως φαίνεται στον πίνακα 2, έγινε σύμφωνα με το μέσο ετήσιο αριθμό επισκέψεων που αναλογούν σε κάθε ιατρό του ΙΚΑ, καθώς και τη μέση ετήσια επιβάρυνση του ιδρύματος από την απασχόληση ενός μόνιμου ιατρού, η οποία περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία του κόστους εργασίας, δηλαδή βασικό μισθό, επιδόματα, υπερωρίες, εργοδοτικές ασφαλιστικές εισφορές κλπ. σε μηνιαία βάση. Δεδομένου ότι το ΙΚΑ δε διαθέτει στοιχεία για τις υπόλοιπες παραμέτρους οι οποίες διαμορφώνουν το συνολικό κόστος μίας επίσκεψης (πχ., αμοιβές υγειονομικού, διοικητικού και βοηθητικού προσωπικού, αξία κτιρίων και κεφαλαιουχικού εξοπλισμού, κόστος αναλώσιμων υλικών, λειτουργικά έξοδα κλπ), για μία ενδεικτική προσέγγιση υποτέθηκε ότι το κόστος εργασίας αποτελεί το 40% περίπου του συνολικού κόστους, δηλαδή με ένα συντελεστή 2.522 (πίνακας 2).

## ΜΕΘΟΔΟΣ

Ως συγκρινόμενα φαρμακευτικά σκευάσματα έχουν επιλεγεί το Salbunova autohaler® του οίκου Lavipharm και το Aerolin Inhaler® του οίκου Glaxo Wellcome για τη σαλβουταμόλη, ενώ για τη διπροπιονική μπεκλομεθαζόνη, επιλέχθηκε το Resprocort® (50 mcg και 250 mcg) και το Becotide® (50 mcg και 250 mcg), των ιδίων οίκων αντίστοιχα. Οι β2-διεγέρτες και η προπιονική μπεκλομεθαζόνη χορηγήθηκαν σε συνήθεις δόσεις των 100 mcg/4ωρο η πρώτη και 50mcgX2/6-8 ώρες ή 250 mcg/12ωρο η δεύτερη. Ο αριθμός των ιατρικών επισκέψεων ορίστηκε σε δύο, μία στην αρχή και μία στο τέλος της συμπληρώσεως του βασικού κύκλου αγωγής, ούτως ώστε να είναι αφ' ενός εφικτή η συνταγογράφηση και αφ' ετέρου η παρακολούθηση και αξιολόγηση της πορείας της νόσου από τους ιατρούς, παρ' ότι είναι πιθανόν ο αριθμός των επισκέψεων να ήταν μεγαλύτερος για ορισμένη αναλογία ασθενών, λόγω εμφανίσεως παρενεργειών ή λόγω ανάγκης περιοδικής/συμπληρωματικής συνταγογραφήσεως. Στην παρούσα μελέτη, δεν ελήφθη υπ' όψη ότι είναι ενδεχόμενο να απαιτηθεί αυξημένη χρήση υγειονομικών υπηρεσιών είτε εξ αιτίας διαφορής αποτελεσματικότητας μεταξύ των δύο σκευασμάτων είτε εξ αιτίας διαφορετικής προσλήψεως της δραστικής ουσίας, λόγω του διαφορετικού τρόπου χορηγήσεώς της, δεδομένου

ότι οι υποθέσεις αυτές αποτελούν αντικείμενο ανάλυσης κόστους-αποτελεσματικότητας (cost-effectiveness analysis) και προϋποθέτουν τη χρησιμοποίηση πρόσθετων κλινικών δεδομένων.

Για λόγους μεθοδολογίας, θεωρήθηκε ότι οι δύο συσκευές περιέχουν ισότιμης θεραπευτικής αξίας θεραπευτικό παράγοντα, εφόσον περιέχουν την ίδια φαρμακευτική ουσία, υπό την ίδια δοσολογία και διαφέρουν μόνο στη διαφορετική τεχνολογία χορηγήσεώς τους. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ανάλυσης ελαχιστοποίησης του κόστους (cost minimization analysis)<sup>21-23</sup>, ως πλέον ενδεδειγμένη μέθοδος, για την οικονομική αξιολόγηση και σύγκριση του κόστους δύο φαρμακευτικών ουσιών, η οποία στηρίζεται στην ευρεία εκτίμηση του κόστους της ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης, δηλαδή τη συνεκτίμηση του άμεσου και έμμεσου κόστους. Δεδομένου ότι μερικά από τα χρησιμοποιούμενα στη μελέτη μεγέθη προήλθαν από έμμεση εκτίμηση βασισμένη σε διεθνείς μελέτες και στην κλινική εμπειρία και όχι από την απευθείας άμεση αξιολόγηση, ιδιαίτερα του φαινομένου της επικουρικής συνταγογραφίας, κρίθηκε σκόπιμη η εφαρμογή της τεχνικής ανάλυσης ευαισθησίας, δηλαδή στη θέση του σταθμικού μέσου όρου των εκτιμήσεων των διαφορετικών υποδειγμάτων υποκαθίσταται διαδοχικά η ευνοϊκότερη τιμή για το ένα σκεύασμα μαζί με τη δυσμενέστερη τιμή για το άλλο και το αντίθετο.

## ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Για τον υπολογισμό του μέσου σταθμικού όρου, αναφορικά με τη συμμόρφωση των ασθενών στη χρήση των υπό εξέταση συσκευών, τα στοιχεία λήφθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία και χωρίς τη μελέτη τυχαιοποιημένου δείγματος πληθυσμού, επιλεγμένου αποκλειστικά για του σκοπούς της παρούσης μελέτης. Συνέπεια της ανωτέρω επιλογής είναι η αδυναμία εκτίμησης του βαθμού ομοιογένειας του συνολικού δείγματος, όπως καθίσταται φανερό από τη διακύμανση του ποσοστού συμμόρφωσης, ιδίως για τη συσκευή MDI.

Ο ανωτέρω περιορισμός επιφέρει άλλες δύο συνέπειες στα παρουσιαζόμενα αποτελέσματα: Την αδυναμία του ακριβούς χρονικού καθορισμού της εμφάνισης δυσανεξίας, καθώς και του καθορισμού του συνο-

λικού διαστήματος της επικουρικής θεραπείας. Συνεπώς, για μια όσο το δυνατότερο ισομερή επίπτωση του κύκλου της θεραπευτικής αγωγής, στο συνολικό κόστος, θεωρήθηκε ότι η συνολική οικονομική επιβάρυνση (κανονικής και επικουρικής αγωγής) για το ποσοστό ασθενών με μη συμμόρφωση, συμπεριλαμβάνει το κόστος μιας επιπλέον ιατρικής επίσκεψης, συν το κόστος ενός κυτίου φαρμακευτικού παράγοντα επικουρικής θεραπείας.

Τέλος, αναφορικά με την επιβάρυνση των ασθενών που προσέρχονται στα εξωτερικά ιατρεία του ΕΣΥ, αυτή υπολογίστηκε ως το 25% της φαρμακευτικής δαπάνης συν το παράβολο των 1000 δραχ. για κάθε επίσκεψη στα Νοσηλευτικά Ιδρύματα. Η ανωτέρω παρα-

δοχή υπερεκτιμά την οικονομική επιβάρυνση των ασφαλισμένων του Δημοσίου και του ΟΓΑ σε σχέση με τους ασφαλισμένους των υπολοίπων φορέων, διότι οι πρώτες δύο κατηγορίες ασθενών δεν επιβαρύνονται στην πραγματικότητα το παράβολο των 1000 δραχ., όπως οι υπόλοιποι.

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το κόστος της φαρμακευτικής φροντίδας συνεκτιμήθηκε με βάση τη λιανική τιμή του κάθε προϊόντος, σε 4813 δραχ. για το Salbunova Autohaler και 993 δραχ. για το Aerolin Inhaler και τη διάρκεια του περιεχομένου της κάθε συσκευασίας με βάση την ημερήσια δο-

Πίνακας 3. Ημερήσιο Φαρμακευτικό Κόστος Θεραπείας Βρογχικού Άσθματος

Φαρμακευτικά Σκευάσματα	Λιανική Τιμή Σκευάσματος σε δραχ.	Κόστος Δόσης σε δραχ.	Εισπνοές ανά Δόση	Δόσεις ανά Ημέρα	Ημερήσιο Κόστος σε δραχ.
<i>Κύρια</i>					
Salbunova	4.813	24,0	2	4	144
Aerolin	993	4,1	2	4	24,6
Respocort 50 mcg	5.056	25,3	2	4	151,8
Becotide 50 mcg	1.360	6,8	2	4	40,8
Respocort 250 mcg	14.374	71,8	2	2	287,2
Becotide 250 mcg	5.423	27,1	2	2	108,4
<i>Επικουρικά</i>					
Severent Diskus	11.683	194,7	1	2	389,4
Flixotide Diskus	10.893	363,0	1	2	726

Πίνακας 4. Συνολικό Φαρμακευτικό Κόστος Κύριας και Επικουρικής Θεραπείας Βρογχικού Άσθματος σε ένα Βασικό Κύκλο Αγωγής

Φαρμακευτικά Σκευάσματα	Ημερήσιο Κόστος σε δραχ.	Ασθενείς	Ημέρες Αγωγής	Συνολικό Κόστος σε δραχ.
<i>Κύρια</i>				
Salbunova	144,0	100	30	432.000
Aerolin	24,6	100	30	73.800
Respocort 50 mcg	151,8	100	30	455.400
Becotide 50 mcg	40,8	100	30	122.400
Respocort 250 mcg	287,2	100	30	861.600
Becotide 250 mcg	108,4	100	30	325.200
<i>Επικουρικά</i>				
Severent Diskus	389,4	39	3	45.560
Flixotide Diskus	726,0	39	3	84.942

σολογία. Αναλόγως υπολογίστηκε για το Resprocort (50 mcg) και Resprocort (250 mcg) Autohaler του οποίου το κόστος είναι 5056 δρχ. και 14374 δρχ., αντίστοιχα και το Becotide (50 mcg) και Becotide (250 mcg) σε 1360 δρχ. και 5423 δρχ., αντίστοιχα.

Με βάση τη χρησιμοποιηθείσα μεθοδολογία, το συνολικό κόστος παρακολούθησης επί (1) μήνα 100

ασθενών με συμπτώματα άσθματος είναι για το Salbunona 2.518.732 δρχ. και για το Aerolin 2.919.437 δρχ., όπως φαίνεται στον πίνακα 5. Κατά συνέπεια, το μέσο κόστος ενός 'μέσου, στατιστικού' ασθενή, δηλαδή του 1% των 100 ασθενών που πάσχουν από άσθμα, υπολογίστηκε σε 25519 δρχ. για αγωγή με βάση το Salbunona, έναντι 29919 δρχ. για αγωγή με βάση το Aerolin,

Πίνακας 5. Συνολικό Κόστος Ιατροφαρμακευτικής Περίθαλψης με Σαλβουταμόλη Χορηγούμενη με Διαφορετική Συσκευή (MDI ή BAI)

	Αγορά	ΕΣΥ	ΙΚΑ
<b>Salbunona (BAI)</b>			
1. Κανονική Παρακολούθηση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	432.000	432.000	432.000
- Ιατρική Περίθαλψη			
2 επισκέψεις / 100 ασθενείς	2.000.000	1.331.000	956.500
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		200.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (1)</b>	<b>2.432.000</b>	<b>1.963.000</b>	<b>1.388.500</b>
2. Μη Συμμόρφωση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	46.732	46.732	46.732
Serevent Diskus			
- Ιατρική Περίθαλψη			
1 επίσκεψη / 4 ασθενείς	40.000	26.620	19.130
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		4.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (2)</b>	<b>86.732</b>	<b>77.352</b>	<b>65.862</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>2.518.732</b>	<b>2.040.352</b>	<b>1.454.362</b>
Συμμετοχή ασθενή (25% φαρμακευτικής δαπάνης + παράβολο επίσκεψης Ε.Ι. ΕΣΥ)	2.518.732	323.683	119.683
Συμμετοχή Ασφαλιστικού Φορέα	0	1.716.669	1.334.679
<b>Aerolin (MDI)</b>			
1. Κανονική Παρακολούθηση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	73.800	73.800	73.800
- Ιατρική Περίθαλψη			
2 επισκέψεις ανά / 100 ασθενείς	2.000.000	1.531.000	956.500
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		200.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (1)</b>	<b>2.073.800</b>	<b>1.804.800</b>	<b>1.030.300</b>
2. Μη Συμμόρφωση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	455.637	455.637	455.637
Serevent Diskus			
- Ιατρική Περίθαλψη			
1 επίσκεψη / 39 ασθενείς	390.000	259.545	186.518
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		39.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (2)</b>	<b>845.637</b>	<b>754.182</b>	<b>642.155</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>2.919.437</b>	<b>2.558.982</b>	<b>1.672.455</b>
Συμμετοχή ασθενή (25% φαρμακευτικής δαπάνης + παράβολο επίσκεψης Ε.Ι. ΕΣΥ)	2.919.437	371.359	132.359
Συμμετοχή Ασφαλιστικού Φορέα	0	2.187.623	1.540.095

με την υπόθεση ότι ο ασθενής χρησιμοποιεί υπηρεσίες στην ελεύθερη αγορά υπηρεσιών υγείας. Στην περίπτωση των ασφαλισμένων που απευθύνονται στα εξωτερικά Ιατρεία του ΕΣΥ, το μηνιαίο συνολικό κόστος για έναν (1) ασθενή εκτιμήθηκε στις 20404 δρχ. και 25590 δρχ με αγωγή με Salbunona και Aerolin, αντίστοιχα. Το κόστος αυτό βαρύνει τους ασφαλιστικούς

οργανισμούς ή το δημόσιο ως εξής: Για την αντιμετώπιση του άσθματος με Salbunona 17167 δρχ. και με Aerolin 21876 δρχ., παραλλήλως οι ασφαλισμένοι επιβαρύνονται για τη θεραπεία με Salbunona με 3237 δρχ. και με Aerolin με 3714 δρχ., ενώ για τους ασφαλισμένους στο ΙΚΑ η μηνιαία συνολική δαπάνη είναι: Για το Salbunona 14544 δρχ. και για το Aerolin 16725 δρχ.

Πίνακας 6. Συνολικό Κόστος Ιατροφαρμακευτικής Περίθαλψης εκατό (100) Ασθενών για τον Έλεγχο του Άσθματος με Διπροπιονική Βεκλομεταζόνη Χορηγούμενη με Διαφορετική Συσκευή (MDI ή BAI)

	Αγορά	ΕΣΥ	ΙΚΑ
<b>Respocort 50 mcg (BAI)</b>			
1. Κανονική Παρακολούθηση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	455.400	455.400	45.540
- Ιατρική Περίθαλψη			
2 επισκέψεις ανά 100 ασθενείς	2.000.000	1.331.000	956.500
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		200.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (1)</b>	<b>2.455.400</b>	<b>1.986.400</b>	<b>1.411.900</b>
2. Μη Συμμόρφωση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη Flixotide Diskus	43.572	43.572	43.572
- Ιατρική Περίθαλψη			
1 επίσκεψη / 4 ασθενείς	40.000	26.620	19.130
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		4.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (2)</b>	<b>83.572</b>	<b>74.192</b>	<b>62.702</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>2.538.972</b>	<b>2.060.592</b>	<b>1.474.602</b>
Συμμετοχή ασθενή (25% φαρμακευτικής δαπάνης +παράβολο επίσκεψης Ε.Ι. ΕΣΥ)	2.538.972	328.743	124.743
Συμμετοχή Ασφαλιστικού Φορέα	0	1.731.849	1.349.859
<b>Becotide 50 mcg (MDI)</b>			
1. Κανονική Παρακολούθηση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	122.400	122.400	122.400
- Ιατρική Περίθαλψη			
2 επισκέψεις ανά / 100 ασθενείς	2.000.000	1.531.000	956.500
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		200.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (1)</b>	<b>2.122.400</b>	<b>1.853.400</b>	<b>1.078.900</b>
2. Μη Συμμόρφωση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη Flixotide Diskus	424.827	424.827	424.827
- Ιατρική Περίθαλψη			
1 επίσκεψη / 39 ασθενείς	390.000	259.545	186.518
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		39.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (2)</b>	<b>814.827</b>	<b>723.372</b>	<b>611.345</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>2.937.227</b>	<b>2.576.772</b>	<b>1.690.245</b>
Συμμετοχή ασθενή (25% φαρμακευτικής δαπάνης +παράβολο επίσκεψης Ε.Ι. ΕΣΥ)	2.937.227	375.807	136.807
Συμμετοχή Ασφαλιστικού Φορέα	0	2.200.965	1.553.438

και για τους ίδιους 1197 δρχ. και 1324 δρχ. αντίστοιχα. Οι εκτιμήσεις αυτές βασίζονται στην παραδοχή ότι η ιατρική υποστήριξη παρέχεται σε μηδενικές τιμές για το χρήστη (πλην της συμμετοχής του ασφαλισμένου στα εξωτερικά Ιατρεία του ΕΣΥ, που ανέρχεται σε 1000 δρχ.), ενώ η φαρμακευτική υποστήριξη έχει κόστος συμμετοχής για τον ασφαλισμένο κατά 25%. Επομένως, η αγωγή με βάση το Salbunova είναι φθηνότερη κατά 13% στο υπόδειγμα της ελεύθερης αγοράς, κατά 20% στο υπόδειγμα του ΕΣΥ και κατά 13% στο υπόδειγμα του ΙΚΑ (πίνακες 5 και 8). Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης των σκευασμάτων Resprocort (50 mcg) και Becotide (50 mcg). Το συνολικό κόστος αντιμετώπισης του άσθματος με Resprocort (50 mcg) είναι 25390 δρχ., έναντι 29372 δρχ. με το Becotide (50 mcg), στο υπόδειγμα της αγοράς, ενώ στο υπόδειγμα στο οποίο ισχύουν τιμές ΕΣΥ είναι 20606 δρχ. και 25768 δρχ. αντίστοιχως. Στο υπόδειγμα στο οποίο ισχύουν τιμές ΙΚΑ είναι 14746 δρχ. και 16902 δρχ. αντίστοιχως. Η συμμετοχή των χρηστών στο δεύτερο υπόδειγμα είναι για το Resprocort (50 mcg) 3287 δρχ., και το Becotide (50 mcg) 3758 δρχ., ενώ στο τρίτο υπόδειγμα είναι 1247 δρχ., και 1368 δρχ., αντίστοιχως. Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αξιολόγησης του Resprocort (250 mcg) και του Becotide (250 mcg), από τα οποία φαίνεται ότι το συνολικό κόστος για το πρώτο υπόδειγμα είναι 29452 δρχ., και 31400 δρχ. αντίστοιχως· για το υπόδειγμα ΕΣΥ είναι 24668 δρχ., και 27796 δρχ. και για το υπόδειγμα ΙΚΑ 18808 δρχ. και 18930 δρχ., αντίστοιχως. Η συμμετοχή στο κόστος από μέρους των ασθενών είναι στο δεύτερο υπόδειγμα για το Resprocort (250 mcg) 4303 δρχ. και για το Becotide (250 mcg) 4265 δρχ., ενώ στο τρίτο υπόδειγμα τα σχετικά μεγέθη είναι 2263 δρχ. και 1875 δρχ., αντίστοιχως. Στους πίνακες 5-7 παρατίθενται, όπως ήδη σημειώθηκε επίσης, τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μελέτης τα οποία έχουν αναλυθεί με διάφορους τρόπους, ώστε να γίνει δυνατή η ανίχνευση ιδιαίτερων πλευρών του ζητήματος. Ο επιμερισμός των αποτελεσμάτων έγινε με το είδος περίθαλψης (ιατρική ή φαρμακευτική) και ανάλογα με το φορέα που καταβάλλει το κόστος (ασφαλιστικό Ταμείο, Δημόσιο ή ασθενείς). Όπως φαίνεται από τους πίνακες αυτούς, οι ασφαλιστικοί οργανισμοί δεν είναι οι μόνοι από τα ενδιαφε-

ρόμενα μέρη για τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, από την υιοθέτηση του κατάλληλου φαρμάκου.

Από την εκτίμηση των σταθμικών μέσων όρων των ποσοστών μη συμμόρφωσης, που αντιστοιχεί στη κάθε μία από τις δύο διαφορετικές τεχνικές χορηγήσεως, βρέθηκε ότι 39% των ασθενών των οποίων η αγωγή βασίστηκε σε συσκευή MDI και 4% εκείνων που χρησιμοποίησαν BAI δεν προσαρμόστηκαν στη τεχνική χορηγήσεως και δεν συμμορφώθηκαν με την υποδειχθείσα θεραπεία. Υποχρεώθηκαν επομένως σε αναζήτηση επικουρικής θεραπείας, που καθορίστηκε σε πρόσθετη ιατρική επίσκεψη και επανάληψη της συνταγογραφίας. Ως επικουρική φαρμακευτική περίθαλψη θεωρήθηκε χορήγηση Serevent Diskus, σε αντικατάσταση της σαλβουταμόλης χορηγούμενης με MDI ή BAI και Flixotide Diskus, σε αντικατάσταση της διπροπιονικής μπεκλομεθαζόνης, χορηγούμενης με MDI ή BAI, παρομοίως. Το κόστος της επικουρικής φαρμακευτικής παρακολούθησης εκτιμήθηκε κατά παρόμοιο τρόπο, λαμβάνοντας υπ' όψη αφ' ενός τη λιανική τιμή του Serevent diskus (11.683 δρχ.) και του Flixotide diskus (10893 δρχ.) και αφ' ετέρου τη διάρκεια της συσκευασίας με βάση τη δοσολογία. Το κόστος της επικουρικής φαρμακευτικής αντιμετώπισης, μετά από αποτυχία συμμόρφωσης, εκτιμήθηκε με ανάλογο τρόπο. Δηλαδή, λήφθηκε υπ' όψη η λιανική τιμή των επικουρικών φαρμάκων σε συνάρτηση με τη συσκευασία, την ημερήσια δοσολογία και τη διάρκεια της αγωγής. Ως λιανική τιμή των σκευασμάτων της επικουρικής φαρμακευτικής αντιμετώπισης, για κάθε ομάδα, θεωρείται η τιμή του συγκεκριμένου σκευάσματος. Στους πίνακες 3 και 4 παρουσιάζονται το φαρμακευτικό ημερήσιο κόστος και το συνολικό κόστος ενός βασικού κύκλου φαρμακευτικής αγωγής για τη κύρια και επικουρική φαρμακευτική θεραπεία.

Με την ανάλυση ευαισθησίας επιχειρείται η διεύρυνση του εύρους των βασικών εκτιμήσεων των εναλλακτικών υποδειγμάτων. Σύμφωνα με τις νέες εκτιμήσεις, όπως παρουσιάζονται στους πίνακες 8-10, η αγωγή με βάση το Salbunova σε σχέση με το Aerolin κυμαίνεται από -3% έως -47%, για το Resprocort (50 mcg) σε σχέση με το Becotide (50 mcg) από -32% έως 1% και για το Resprocort (250 mcg) σε σχέση με το Becotide (250 mcg) από το -24% έως 13%. Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις της ανάλυσης ευαισθησίας, με βάση το

Πίνακας 7. Συνολικό Κόστος Ιατροφαρμακευτικής Περίθαλψης για τον Έλεγχο του Άσθματος με Διπροπιονική Βεκλομεταζόνη (250 mcg) χορηγούμενη με Διαφορετική Συσκευή (MDI ή BAI)

	Αγορά	ΕΣΥ	ΙΚΑ
<b>Respocort 250 mcg (BAI)</b>			
1. Κανονική Παρακολούθηση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	861.600	861.600	861.600
- Ιατρική Περίθαλψη			
2 επισκέψεις / 100 ασθενείς	2.000.000	1.331.000	956.500
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		200.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (1)</b>	<b>2.861.600</b>	<b>2.392.600</b>	<b>1.818.100</b>
2. Μη Συμμόρφωση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	43.572	43.572	43.572
Flixotide Diskus			
- Ιατρική Περίθαλψη			
1 επίσκεψη / 4 ασθενείς	40.000	26.620	19.130
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		4.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (2)</b>	<b>83.572</b>	<b>74.192</b>	<b>62.702</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>2.945.172</b>	<b>2.466.792</b>	<b>1.880.802</b>
Συμμετοχή ασθενή (25% φαρμακευτικής δαπάνης			
+παράβολο επίσκεψης Ε.Ι. ΕΣΥ)	2.945.172	430.293	226.293
Συμμετοχή Ασφαλιστικού Φορέα	0	2.036.499	1.654.509
<b>Becotide (250 mcg)</b>			
1. Κανονική Παρακολούθηση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	325.200	325.200	325.200
- Ιατρική Περίθαλψη			
2 επισκέψεις ανά / 100 ασθενείς	2.000.000	1531000	956500
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		200000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (1)</b>	<b>2.325.200</b>	<b>2.056.200</b>	<b>1.281.700</b>
2. Μη Συμμόρφωση			
- Φαρμακευτική Περίθαλψη	424.827	424.827	424.827
Flixotide Diskus			
- Ιατρική Περίθαλψη			
1 επίσκεψη / 39 ασθενείς	390.000	259.545	186.518
Κόστος επίσκεψης στα Ε.Ι. ΕΣΥ		39.000	
<b>ΣΥΝΟΛΟ (2)</b>	<b>814.827</b>	<b>723.372</b>	<b>611.345</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>3.140.027</b>	<b>2.779.572</b>	<b>1.893.045</b>
Συμμετοχή ασθενή (25% φαρμακευτικής δαπάνης			
+παράβολο επίσκεψης Ε.Ι. ΕΣΥ)	3.140.027	426.507	187.507
Συμμετοχή Ασφαλιστικού Φορέα	0	2.353.065	1.705.538

μέσο σταθμικό όρο, η αγωγή με βάση το Aerolin είναι ακριβότερη από ότι αυτή με βάση το Salbunona και η διαφορά συνολικού κόστους κυμαίνεται από 3% έως 14%. Όσον αφορά τη συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ άλλων σκευασμάτων, δηλαδή Respocort (50 mcg) και Becotide (50 mcg), η διαφορά κόστους κυμαίνεται από 10-14% υπέρ της πρώτης μορφής χορήγησης, ενώ το

Respocort (250 mcg) είναι φθηνότερο από το Becotide (250 mcg) από 1%-11% και στα τρία υποδείγματα. Από την ανάλυση ευαισθησίας προκύπτει ότι, η δυσμενέστερη υπόθεση για το Salbunona σε σχέση με το Aerolin, δίδει διαφορά κόστους από -28% έως -3%, ενώ η ευνοϊκότερη από -48% έως -27%. Αντιστοίχως για το Respocort (50 mcg) σε σχέση με το Becotide (50 mcg),

Πίνακας 8. Ανάλυση Εναισθησίας των υπό σύγκριση σκευασμάτων με βάση το Μέσο Σταθμικό Όρο (96% BAI και 61% MDI)

	Αγορά	Δημόσιο	Κοινωνική Ασφάλιση
(α) Salbunova	2.518.732	2.040.352	1.454.362
(β) Aerolin	2.919.437	2.558.982	1.672.455
α:β	0,86	0,80	0,87
α-β	-400.705	-518.630	-218.093
(α) Respocort 50 mcg	2.538.972	2.060.592	1.474.602
(β) Becotide 50 mcg	2.937.227	2.576.772	1.690.245
α:β	0,86	0,80	0,87
α-β	-398.255	-516.180	-215.643
(α) Respocort 250 mcg	2.945.172	2.466.792	1.880.802
(β) Becotide 250 mcg	3.140.027	2.779.572	1.893.045
α:β	0,94	0,89	0,99
α-β	-194.855	-312.780	-12.243

Πίνακας 9. Ανάλυση Εναισθησίας των υπό σύγκριση σκευασμάτων με βάση τον Ευμενέστερο Βαθμό Συμμόρφωσης για το BAI (100%) και τον Δυσμενέστερο για το MDI (42%)

	Αγορά	Δημόσιο	Κοινωνική Ασφάλιση
(α) Salbunova	2.432.000	1.963.000	1.388.500
(β) Aerolin	3.331.414	2.926.404	2.627.454
α:β	0,73	0,67	0,53
α-β	-899.414	-963.404	-1.238.954
(α) Respocort 50 mcg	2.455.400	1.986.400	1.411.900
(β) Becotide 50 mcg	3.334.194	2.929.184	1.988.079
α:β	0,74	0,68	0,71
α-β	-878.794	-942.784	-576.179
(α) Respocort 250 mcg	2.861.600	2.392.600	1.818.100
(β) Becotide 250 mcg	3.536.994	3.131.984	2.190.879
α:β	0,81	0,76	0,83
α-β	-675.394	-739.384	-372.779

η δυσμενέστερη υπόθεση για τη συσκευή BAI, δίδει διαφορά από -10% έως +1% και η ευνοϊκότερη από -32% έως -6%. Αναλόγως για το Respocort (250 mcg), σε σχέση με το Becotide (250 mcg), η δυσμενέστερη υπόθεση έχει διαφορά κόστους από -1% έως +13% και η ευνοϊκότερη από -19% έως -24%. Στον πίνακα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης ευαισθησίας, σχετικά με την επιβάρυνση του δημοσίου και ασφαλιστικού συστήματος από τη χρησιμοποίηση των υπό σύγκριση των φαρμακευτικών σκευασμάτων. Οι ίδιοι οι ασθενείς θα είχαν επίσης κάποιο οικονομικό όφελος, εάν έκαναν χρήση της ασφαλιστικής τους κά-

λυψης από κάποιο ταμείο ασθενείας. Από τα αποτελέσματα είναι προφανές ότι η χορήγηση Salbunova Autohaler είναι φθηνότερη από τη χορήγηση Aerolin, στο δεύτερο κυρίως, αλλά και στο τρίτο υπόδειγμα. Η διαφορά ανάμεσα στο Respocort (50 mcg) και το Becotide (50 mcg) είναι πάλι υπέρ της πρώτης μορφής χορήγησης, ενώ το Respocort (250 mcg) είναι και πάλι φθηνότερο από το Becotide (250 mcg). Η ανάλυση θα ήταν περισσότερο ακριβής, αν οι υποθέσεις στις οποίες βασίζονται οι εκτιμήσεις για το κόστος περιείχαν στοιχεία για το κόστος μετάβασης στους τόπους παροχής υπηρεσιών, την απώλεια χρόνου, τη διαφορά των δύο



Πίνακας 10. Ανάλυση Ευαισθησίας των υπό σύγκριση σκευασμάτων με βάση το Δυσμενέστερο Βαθμό Συμμόρφωσης για το BAI (90%) και τον Ευμενέστερο για το MDI (70%)

	Αγορά	Δημόσιο	Κοινωνική Ασφάλιση
(α) Salbunova	2.648.830	2.156.380	1.553.155
(β) Aerolin	2.724.290	2.384.940	2.166.420
α:β	0,97	0,90	0,72
α-β	-75.460	-228.560	-613.265
(α) Respocort 50 mcg	2.664.330	2.171.880	1.568.655
(β) Becotide 50 mcg	2.749.190	2.409.840	1.549.165
α:β	0,97	0,90	1,01
α-β	-84.860	-237.960	19.490
(α) Respocort 250 mcg	3.070.530	2.578.080	1.974.855
(β) Becotide 250 mcg	2.951.990	2.612.640	1.751.965
α:β	1,04	0,99	1,13
α-β	118.540	-34.560	222.890

Πίνακας 11. Ευαισθησία των υπό σύγκριση φαρμακευτικών σκευασμάτων σχετικά με την Επιβάρυνση του Δημόσιου και Ασφαλιστικού Συστήματος

	ΕΣΥ	ΙΚΑ
(α) Salbunova	1.716.669	1.334.679
(β) Aerolin	2.187.623	1.540.095
α:β	0,78	0,87
α-β	-470.954	-205.416
(α) Respocort 50 mcg	1.731.849	1.411.900
(β) Becotide 50 mcg	2.200.965	1.553.438
α:β	0,79	0,91
α-β	-469.116	-141.538
(α) Respocort 250 mcg	2.036.499	1.654.509
(β) Becotide 250 mcg	2.353.065	1.705.538
α:β	0,87	0,97
α-β	-316.566	-51.029

σκευασμάτων στις ανεπιθύμητες ενέργειες και, βεβαίως, στη διαφορά αποτελεσματικότητας εξ αιτίας της σημαντικής διαφοράς συμμόρφωσης στις υπό σύγκριση συσκευές χορήγησης.

Όπως προκύπτει από την απλή επεξεργασία των δεδομένων της μελέτης, η δαπάνη για φαρμακευτική περίθαλψη, ως ποσοστό του συνολικού κόστους, είναι μέτρια έως χαμηλή εξ αιτίας του ιδιαίτερου χαρακτήρα της νόσου και των εναλλακτικών προγραμμάτων που εξετάζονται σ' αυτή τη μελέτη, στα οποία το ενδεχόμενο νοσοκομειακής περίθαλψης έχει αποκλεισθεί,

όπως ήδη σημειώθηκε. Επίσης η παροχή πρωτοβάθμιας ιατρικής φροντίδας αναδεικνύεται εκ των πραγμάτων ότι έχει σημαντικό βαθμό υποκατάστασης ως προς τη φαρμακευτική φροντίδα. Κατά συνέπεια, μια μικρή αλλαγή των τιμών των ιατρικών επισκέψεων στο δεύτερο και στο τρίτο υπόδειγμα θα επιδεινώνει περαιτέρω την υφιστάμενη εικόνα, εις βάρος των σκευασμάτων τα οποία εμφανίζουν μικρότερο βαθμό συμμόρφωσης.

Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης συγκριτικής μελέτης οικονομικής αξιολόγησης ουσιών, εμφανίζουν υψηλό κόστος ιατρικής περίθαλψης στην περίπτωση μη συμμόρφωσης στη χρήση και επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το επίπεδο των αμοιβών του ιατρικού προσωπικού. Κατά συνέπεια, οποιαδήποτε αλλαγή στις αμοιβές των ιατρών επιδρά δυσμενώς στο συνολικό κόστος θεραπείας και ειδικότερα στα σκευάσματα με χαμηλό δείκτη συμμόρφωσης. Σημειώνεται προσθέτως ότι η διακύμανση στη διαφορά κόστους μεταξύ των τριών υποδειγμάτων οφείλεται, πέραν της επίδρασης του βαθμού συμμόρφωσης και στο διαφορετικό κόστος εργασίας.

Συμπερασματικά, η αξιολόγηση των υπό σύγκριση φαρμάκων έδειξε ότι η διαφορά κόστους στην ελεύθερη αγορά, στην οποία οι ιατρικές αμοιβές είναι υψηλότερες, είναι σαφής, με φθηνότερη τη χρήση συσκευής BAI, γεγονός το οποίο ισχύει σε όλα τα υποδείγματα. Οι διαφορές κόστους, στο υπόδειγμα τιμών του δημοσίου κυμαίνονται μεταξύ 11 και 20%, ενώ στην περί-

πωση της κοινωνικής ασφάλισης υπάρχουν σαφείς διαφορές μεταξύ Salbunona και Aerolin και Resprocort (50 mcg) και Becotide (50 mcg), ενώ στην περίπτωση του Resprocort (250 mcg) η διαφορά του συνολικού κόστους είναι μη αξιολογήσιμη.

Είναι προφανές ότι τα σκευάσματα τα οποία χορηγούνται με συσκευή ενεργοποιούμενη με την εισπνοή, υποκαθιστούν σε σημαντικό βαθμό ιατρική εργασία, έχουν μεγαλύτερη αποδοχή στις προτιμήσεις των χρηστών και διασφαλίζουν την ποιότητα της φροντίδας, στοιχεία τα οποία στην φαρμακοοικονομική προσέγγιση είναι αναγκαίο να συνυπολογίζονται.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν το συνολικό κόστος της φαρμακευτικής φροντίδας ασθενών που πάσχουν από ήπιο ή μέτριο άσθμα με χρησιμοποίηση διαφορετικών φαρμακευτικών σχημάτων. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η διαφορά κόστους ίσως αποτελεί υποεκτίμηση της πραγματικής διαφοράς του κόστους. Η διαφορά κόστους θα είναι ασφαλώς διαφορετική εάν συνυπολογισθεί: α) Το κόστος σε σχέση με τις ανεπιθύμητες ενέργειες από χαμηλή συμμόρφωση, που συνεπάγονται σχεδόν υποχρεωτικά νέα επίσκεψη στο γιατρό και β) το υψηλό κόστος της ιδρυματικής περίθαλψης ή της φροντίδας στο σπίτι ηλικιωμένων ατόμων χωρίς αυτονομία.

Είναι αναγκαίο να σημειωθούν τρεις μεθοδολογικές παρατηρήσεις ιδιαίτερης σημασίας. Η πρώτη αφορά στην επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου οικονομικής αξιολόγησης για τις ανάγκες αυτής της μελέτης δηλαδή της ανάλυσης ελαχιστοποίησης κόστους. Η μέθοδος αυτή εστιάζει κυρίως στην εξέταση του κόστους βασιζόμενη στην παραδοχή ότι, οι υπό σύγκριση φαρμακευτικές ουσίες - στην περίπτωση αυτή δύο βρογχοδιασταλτικά φαρμακευτικά σκευάσματα, είναι απολύτως ισοδύναμες ως προς τα αποτελέσματά τους.

Οι υπεύθυνοι της πολιτικής υγείας και όσοι λαμβάνουν αποφάσεις πρέπει να συνεκτιμήσουν το γεγονός ότι μικρότερη αποτελεσματικότητα συνεπάγεται και μεγαλύτερη πιθανότητα επανεμφάνισης των συμπτωμάτων ή ακόμη και κίνδυνο επιδείνωσης. Όπως είναι γνωστό, η μη συμμόρφωση συντελεί στη διατήρηση των συμπτωμάτων.

Σημαντική παράμετρο - για τη σύγκριση του κόστους των δύο συσκευών - παριστά η ορθή χρήση της συσκευής και, κατά συνέπεια, της συμμόρφωσης στη θεραπευτική αγωγή. Πρόσφατες έρευνες έχουν καταλήξει στη διαπίστωση ότι ένα μέρος των ασθενών δε μπορεί να χρησιμοποιήσει με την ίδια ευστοχία τις ειδικές συσκευές, όπως φαίνεται στον πίνακα 1. Τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών, σχετικά με τη συμμόρφωση των ασθενών σε διαφορετικής τεχνολογίας συσκευές χορηγήσεως εισπνεομένων παραγόντων, στις οποίες συγκρίνεται η χορήγηση σαλβουταμόλης ή διπροπιονικής μεκλομεθαζόνης, μέσω MDI ή BAI έδειξαν σημαντικές διαφορές<sup>24-27</sup>. Σημειώνεται ότι από την εκτίμηση του μεσοσταθμικού όρου αποκλείστηκαν περιπτώσεις με πολύ χαμηλή συμμόρφωση, που αποδόθηκε στην παντελή απουσία υποδείξεων, συστάσεων και εκπαιδεύσεως των ασθενών στη χρήση των συσκευών.

Είναι γεγονός ότι το σύνολο των ασφαλιστικών οργανισμών και των υπηρεσιών του δημοσίου τομέα δεν διαθέτει τεχνικές, οι οποίες επιτρέπουν την πραγματική και ακριβή προσέγγιση του κόστους με πραγματικές τιμές<sup>28</sup>, εξ αιτίας της απουσίας τμηματικών προϋπολογισμών ή και στοιχείων που περιλαμβάνουν αναλυτικά τις πραγματικές, κατά περίπτωση, τακτικές και μη αμοιβές του ιατρικού, νοσηλευτικού και διοικητικού προσωπικού, την αξία υπέρξεως τεχνολογίας, της υποδομής και τις αποσβέσεις. Για το λόγο αυτό υιοθετούνται πολλές φορές σκιώδεις τιμές (shadow prices), οι οποίες προσδιορίζονται από τα διαθέσιμα στοιχεία και την αναγκαία αναγωγή τους, ώστε να ανταποκρίνονται όσο το δυνατό περισσότερο στα πραγματικά δεδομένα.

## SUMMARY

*A Comparative Economical Evaluation of a Metered Dose Inhaler and Breath Actuated Inhaler Releasing Salbutamol or Beclomethazone Dipropionate for Asthma Treatment*

*J. Kiriopoulou, A. Grigoriou, G. Mathioudakis, M. Gitona, G. Karalis, G. Rotziokos, E. Georgousi, A. Dedousi*

*Our comparative economical study on cost differences between two discrete salbutamol (S) and beclomethazone dipropionate (BDP) release inhalers (metered dose inhalers, MDI vs breath actuated inhalers, BAI) resulted in the following conclusions. MDI seems to be 14% more expensive when it is used to release S by asthmatic patients, without any social insurance coverage, in comparison with the breath actuated device (BAI). When the devices under study were used to release BDP we also found cost difference. **Pneumon 2000, 13 (2): 123-136***

**Key words:** *Asthma, metered dose inhaler, dry powder inhaler, breath actuated metered dose inhaler, therapy cost*

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Epstein SW.: Survey of the clinical use of pressurized aerosol inhalers. CMA Journal, 1979, 120:813-6.
2. Gayard P., Orehek J.: Inadequate use of pressurized aerosols by asthmatic patients. Respiration 40(1), 1980, 40(1):47-52.
3. Shim CL., Williams MH.: The adequacy of inhalation of aerosol from canister nebulizers. Am J Med.1980, 69(6):891-4.
4. Crompton GK.: Problems patients have using pressurized aerosol inhalers. Eur J Respir Dis 1982, 63(suppl 119):101-4.
5. Lee HS.: Proper aerosol inhalation technique for delivery of asthma medications. Clin Ped (Phila), 1983, 22(6):440-3.
6. Peterson S., Ostegaard PA.: Nasal inhalation as a cause of inefficient pulmonary aerosol inhalation technique in children. Allergy 1983, 38(3):191-4.
7. Allen SC., Prior A.: What determines whether an elderly patient can use a metered dose inhaler correctly? Br. J., Dis., Chest, 1986,80:45-9.
8. Lindgren S., Bake B., Larson S.: Clinical consequences of inadequate inhalation technique in asthma therapy. Eur J Respir Dis, 1987, 70(2):93-8.
9. Crompton GK.: Clinical assessment of a new breath actuated inhaler. Practitioner, 1989, 233(1453):268-9.
10. De Blaquiére P., Christensen DB., Carter WB., Martin TR.: Use and misuse of metered dose inhalers by patients with chronic lung disease. A controlled randomized trial of two instruction methods. Am Rev Respir Dis, 1989, 140(4):910-6.
11. Chapman PK., Love L., Brudacker H.: A comparison of breath actuated and conventional metered dose inhaler inhalation technique in elderly subjects, 1993, Chest 104,5.
12. Hanania Na., Wittman R., Keststein S., Kenneth R., Chapman PK: Medical personnel's knowledge of and ability to use inhaling devices. Chest, 1994, 105,1.
13. Newman Sp., Weisz AWB., Talacee N., Clarke SW.: Improvement of drug delivery with a breath pressurized aerosol for patients with poor inhaler technique, 1991, Thorax 46:712-716.
14. Zainudin BM., Biddiscombe M., Tolfree SE., Short M., Spiro SG.: Comparison of bronchodilator response and deposition patterns of salbutamol inhaled from a pressurized metered dose inhaler as a dry powder and as a nebulized solution. Thorax, 1990, 45(6): 469-73.
15. Meichor R., Biddiscombe MF., Mak VH., Short MD., Spiro SG.: Lung deposition patterns of directly labelled salbutamol in normal subjects and in patients with reversible airflow obstruction. Thorax, 1993, 48(5):516-11.
16. Coady DJ, et al. Evaluation of a breath actuated pressurized aerosol. Clinical Allergy, 1976, 6:1-6.
17. Waterhouse JC., Simmons JL., Wray H., Howard P.: Comparative assessment of a new breath actuated inhaler in patients with reversible airways obstruction. Respiration 1982, 59:155-158.
18. Town GI., Eption MJ., Martin IR., Frost G.: Comparative asthma control and certainty of dose delivery with two breath actuated asthma inhalers. Eur J Clin Res

- 1994, 5:161-169.
19. Ματσαγγάνης Μ., Ροκκάς Θ., Χατζηανδρέου Ε., Κυριόπουλος Γ.: Οικονομική αξιολόγηση της εκρίζωσης του ελικοβακτηριδίου του πλωρού. Κοινωνία, Οικονομία και Υγεία, 1995, 4,3, 164-185.
  20. Ματσαγγάνης Μ., Τόγιας Δ., Χατζηανδρέου Ε., Κυριόπουλος Γ.: Οικονομική αξιολόγηση δύο εισπνεομένων στεροειδών για την αντιμετώπιση του μέτριου άσθματος. Τομέας Οικονομικών Υγείας. Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας. 1996.
  21. Drumond MF.: Principles of economic appraisal in health care. Oxford University Press, 1980.
  22. Drumond MF.: Studies in economic appraisal in health care. Oxford University Press, 1981.
  23. Κυριόπουλος Γ., Γείτονα Μ., Σκουρολιάκου Μ. Φαρμακοοικονομία. Αρχές και μέθοδοι αξιολόγησης. Εξάντας, Αθήνα, 1996.
  24. Newman SP., Morren F., Trofast E., Talaee N., Clarke SW.: Deposition and clinical efficacy of terbutaline sulphate from turbuhaler, a new multi dose powder inhaler. Eur Respir J, 1991, 2(3):247-52.
  25. Ferguson RJ., Lenney J., McHardy GJR., Crompton GK.: The use of a new breath actuated inhaler by patients with severe airflow obstruction. Eur Respir J, 1991, 4:172-174.
  26. Larsen JS., Pharm D., Hahn M., Kochevar JW., Morris RJ., Kaiser HB., Weisberg SC., Halverson PC., Qwssy SN.: Administration errors with a conventional metered dose inhaler versus a novel breath actuated device. JNL Allergy, 1993, 71(2)103-6.
  27. Marshik PL., Larsen JS., Leach Cl., Halversom PC., Ekholm BP., Amies MH., Kaiser HB., Weisberg SC., Sellers JA.: A novel breath actuated device (autohaler) consistently actuates during the early phase of inspiration. J Aerosol Med 1995, 8:2.
  28. Gitona M., Kornarou H., Kyriopoulos J., Papanizos V.: A planned model for AIDS patients based on national cost estimates and managerial deficits. In: Kyriopoulos J., Kornarou, H., Gitona, M (Eds): AIDS Economics: Cost analysis, management and prospective financing Exandas, Athens, 1996, 103-113.

## Ο "ΠΝΕΥΜΩΝ" στο Διαδίκτυο!

Αναζητείστε τον στη διεύθυνση:

[www.mednet.gr/pneumon](http://www.mednet.gr/pneumon)

# Η κινητική του οξυγόνου κατά την πρόιμη φάση της ανάκαμψης μετά από μέγιστη καρδιοαναπνευστική κόπωση σε ενήλικες ασθενείς με κυστική ίνωση σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου

Ε. Πούλιου<sup>1</sup>  
Σ. Νανάς<sup>2</sup>  
Α. Παπαμιχαλόπουλος<sup>1</sup>  
Α. Σαμακοβλή<sup>2</sup>  
Θ. Κυπριανού<sup>2</sup>  
Μ. Δημητρίου<sup>1</sup>  
Ειρ. Μαύρου<sup>2</sup>  
Γ. Περπάτη<sup>1</sup>  
Β. Κοτσοβούλου<sup>1</sup>  
Χ. Ρούσσος<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ιατρείο Κυστικής Ίνωσης Νοσοκομείου Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών, <sup>2</sup>Κλινική Εντατικής Θεραπείας Εθνικού Πανεπιστημίου

Λέξεις κλειδιά: Κυστική ίνωση, άσκηση, κινητική του οξυγόνου, κλίμακα Schwachman

Αλληλογραφία:  
Ελένη Πούλιου, 2η Πνευμονολογική Κλινική, Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών, Μεσογείων 152, 11 527 Αθήνα, τηλ. 7773508

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Η μέγιστη κατανάλωση οξυγόνου κατά την καρδιοαναπνευστική δοκιμασία κοπώσεως (ΚΑΔΚ) έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ανοχής στην κόπωση των ασθενών με κυστική ίνωση (ΚΙ). Οι παράγοντες που καθορίζουν την κατανάλωση του οξυγόνου, μετά το πέρας της κοπώσεως, δεν είναι γνωστοί. Εκτιμήσαμε τους δείκτες της κινητικής του οξυγόνου κατά την μέγιστη ΚΑΔΚ και την πρόιμη φάση της ανάκαμψης και διερευνήσαμε τη σχέση τους με τη βαρύτητα της νόσου όπως αυτή καθορίζεται από την κλίμακα Schwachman (SS). Μελετήθηκαν 19 ασθενείς με ΚΙ (10 άνδρες / 9 γυναίκες, ηλικίας  $24\pm 13$ , SS  $71\pm 14$ ) και 11 υγιείς μάρτυρες (3 άνδρες / 8 γυναίκες, ηλικίας  $29\pm 4$ ).

Όλοι οι ασθενείς και οι υγιείς μάρτυρες υπεβλήθησαν σε μέγιστη ΚΑΔΚ πάνω σε κυλιόμενο τάπητα. Υπολογίσθηκε η μέγιστη κατανάλωση οξυγόνου ( $VO_{2peak}$ ) και η κλίση καμπύλης κατανάλωσης του οξυγόνου ( $VO_{2/t-slope}$ ) κατά την πρόιμη φάση της ανάκαμψης. Η μέγιστη κατανάλωση οξυγόνου ήταν στατιστικώς χαμηλότερη στους ασθενείς με ΚΙ σε σχέση με αυτήν των υγιών μαρτύρων ( $21\pm 8$  vs  $35\pm 8$  ml/kg/ml  $p<0.01$ ). Στους ασθενείς με ΚΙ η κλίση- $VO_{2/t}$  παρουσίασε συσχέτιση με την  $VO_{2peak}$  ( $r=0.92$ ,  $p<0.001$ ), καθώς και με το SS ( $r=0.86$ ,  $p<0.001$ ). Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η παράταση της ανάκαμψης μετά από μέγιστη ΚΑΔΚ, τους ασθενείς με ΚΙ σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου. *Πνεύμων 2000, 13 (2): 137-143*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εργασία παρελήφθη στις 14/12/1999 και εγκρίθηκε προς δημοσίευση στις 18/5/2000.

Η κυστική ίνωση είναι η πιο συχνή γενετική νόσος της λευκής φυλής. Οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου που βρίσκεται στο μακρό τμήμα

του χρωματοσώματος 7 το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως διάλυτος ιόντων χλωρίου και ενεργοποιείται από το c-AMP μέσω φωσφορυλίωσής του από την πρωτεϊνική κινάση-A και η οποία απαιτεί σύνδεση με ATP για τη διάνοξη του διαύλου<sup>1</sup>.

Μεταλλάξεις της CFTR προκαλούν παθολογική συγκέντρωση χλωρίου στα επιθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την αφυδάτωση των εκκρίσεων, η οποία, στο επίπεδο των αεραγωγών, προκαλεί μείωση της βλενοκροσσωτής κάθαρσης με επακόλουθο λοιμώξεις και βρογχεκτασίες, ενώ στο επίπεδο του παγκρέατος οι παχύρρευστες εκκρίσεις προκαλούν απόφραξη των παγκρεατικών πόρων με επακόλουθο παγκρεατική ανεπάρκεια και υποθρεψία<sup>2</sup>.

Η μέγιστη κατανάλωση οξυγόνου (VO<sub>2</sub>-peak) κατά την καρδιοαναπνευστική δοκιμασία κοπώσεως (ΚΑΔΚ) έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της λειτουργικής ικανότητας των ασθενών με κυστική ίνωση<sup>3</sup>.

Οι παράγοντες, που καθορίζουν την κατανάλωση του οξυγόνου κατά τη φάση της ανάκαμψης, μετά από άσκηση, στους ασθενείς με κυστική ίνωση δεν είναι γνωστοί. Στην εργασία αυτή εκτιμήσαμε τους δείκτες της κινητικής του οξυγόνου κατά την μέγιστη ΚΑΔΚ και την πρώιμη φάση της ανάκαμψης, καθώς και τη σχέση τους με τη βαρύτητα της νόσου όπως αυτή εκτιμάται με την κλίμακα Schwachman's<sup>4</sup>.

Στα υγιή άτομα η κατανάλωση του οξυγόνου μειώνεται ταχύτατα μετά το πέρας της άσκησης. Κατά την πρώιμη (αγαλακτική) φάση της ανάκαμψης, το οξυγόνο χρησιμοποιείται κυρίως για τη επαναφωσφορυλίω-

ση της κρεατίνης των σκελετικών μυών και η ταχεία πτώση της κατανάλωσης του οξυγόνου κατά τη φάση αυτή εξαρτάται, τουλάχιστον εν μέρει, από τον ρυθμό με τον οποίο λαμβάνει χώραν αυτή η διαδικασία<sup>5</sup>.

Υποθέσαμε ότι η αποκατάσταση των ενεργειακών αποθεμάτων των μυών, όπως αυτή αντανάκλαται στην κινητική του οξυγόνου κατά την πρώιμη φάση της ανάκαμψης, σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η διερεύνηση της σχέσεως της βαρύτητας της νόσου με τους δείκτες της κινητικής του οξυγόνου κατά τη μέγιστη ΚΑΔΚ και την πρώιμη φάση της ανάκαμψης.

## ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στη μελέτη αυτή περιελήφθησαν 19 ασθενείς με κυστική ίνωση (10 άνδρες/9 γυναίκες, ηλικίας 24 ± 13), που παρακολουθούντο στο τακτικό εξωτερικό ιατρείο του Νοσοκομείου Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών και 11 υγιείς μάρτυρες (3 άνδρες/8 γυναίκες, ηλικίας 29±4). Στον πίνακα 1 φαίνονται τα χαρακτηριστικά των δύο ομάδων. Όλοι οι ασθενείς κατά τον χρόνο της μελέτης ήταν σε σταθερή κατάσταση. Ασθενείς με πρόσφατη παρόξυνση της νόσου, καθώς και ασθενείς με αναπνευστική ανεπάρκεια ή άλλες καταστάσεις που επηρεάζουν την ικανότητα για άσκηση αποκλείονταν από τη μελέτη. Η διάγνωση στηρίχθηκε στην κλινική εκτίμηση και τις εργαστηριακές εξετάσεις συμπεριλαμβανομένων της δοκιμασίας ιδρώτα και του γονοτύπου. Οι υγιείς μάρτυρες ήταν εθελοντές χωρίς σημεία καρδιολογικού ή αναπνευστικού νοσήματος, σύμφωνα με το ιστορικό και την κλινική εξέταση.

Πίνακας 1. Ανθρωπομετρικές κλινικές και λειτουργικές παράμετροι ασθενών με κυστική ίνωση και υγιών μαρτύρων

	Ασθενείς		Υγιείς μάρτυρες	
	<i>x</i> ± <i>sd</i>	Εύρος	<i>x</i> ± <i>sd</i>	Εύρος
Φύλο (Α/Γ)	10/9	-	3/8	-
Ηλικία (χρ)	24±13	14-61	29±4	22-36
Αποικισμός με ψευδομονάδα (Ναι/Όχι)	11/8	-	-	-
Παγκρεατική προσβολή (Ναι/Όχι)	8/11	-	-	-
Κλίμακα Schwachman	71±14	50-90	-	-
FEV <sub>1</sub> (% προβλ.)	65.7±34.9	23-128	112,1±9,5	101-125
FVC (% προβλ.)	82.6±27.4	29-130	113±11	97-128
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	62,5±21.3	25-91	84,4±5,5	80-97
DLco (% προβλ.)	70±35	23-122	-	-

### Εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου:

Χρησιμοποιήθηκαν δείκτες όπως ο  $FEV_1$  (% προβλ.),  $VO_2$  peak και η κλίμακα Schwachman. Η κλίμακα Schwachman score αποτελεί συνυπολογισμό τεσσάρων διαφορετικών παραμέτρων της νόσου. Της καθημερινής δραστηριότητας, των κλινικών σημείων, της θρέψης-ανάπτυξης και συγκεκριμένα, της ακτινολογικής εικόνας<sup>4</sup>.

### Λειτουργικές δοκιμασίες:

Σε όλους τους συμμετέχοντες στη μελέτη μετρήθηκαν οι FVC,  $FEV_1$ , και η διαχυτική ικανότητα (DLco) με τη μέθοδο της μιάς αναπνοής<sup>6</sup>.

### Καρδιοαναπνευστική δοκιμασία κοπώσεως (ΚΑΔΚ):

Η καρδιοαναπνευστική δοκιμασία κοπώσεως (ΚΑΔΚ) έγινε σε κυλιόμενο τάπητα (Marquette Electronics 2000) κατά το πρωτόκολλο Bruce ή τροποποιημένο Naughton. Γινόταν καταγραφή ανά λεπτό 12 ΗΚΓφικών απαγωγών με χρήση του συστήματος MAX 1 (Marquette Electronics). Μέτρηση της αρτηριακής πίεσεως γινόταν κάθε δύο λεπτά με υδραργυρικό σφυγμομανόμετρο. Γινόταν συνεχής καταγραφή του κορεσμού με οξύμετρο. Αυτοεκτίμηση του βαθμού της δυσπνοίας γινόταν με τη χρήση της κλίμακας Borg<sup>7</sup>.

Η κατανάλωση του οξυγόνου ( $VO_2$ ), η παραγωγή διοξειδίου ( $VCO_2$ ) και η ροή μετρήθηκαν με τη μέθοδο αναπνοή-αναπνοή με τον καταγραφέα Vmax 229 (Sensormedics). Το σύστημα ήταν βαθμολογημένο με πρότυπο αέριο γνωστής συγκέντρωσης πριν από κάθε δοκιμασία. Οι μετρήσεις έγιναν στην όρθια θέση πριν, κατά τη διάρκεια της άσκησης και τα πρώτα 10 λεπτά μετά το πέρας της δοκιμασίας, κατά τη φάση της ανάκαμψης σε καθιστή θέση. Ως βασική  $VO_2$  θεωρήθηκε ο μέσος όρος των τιμών που μετρήθηκαν για δύο λεπτά προ της ενάρξεως της δοκιμασίας. Ως  $VO_2$  peak θεωρήθηκε η μέση τιμή των μετρήσεων που έγιναν για 20 sec πριν από το τέλος της δοκιμασίας.

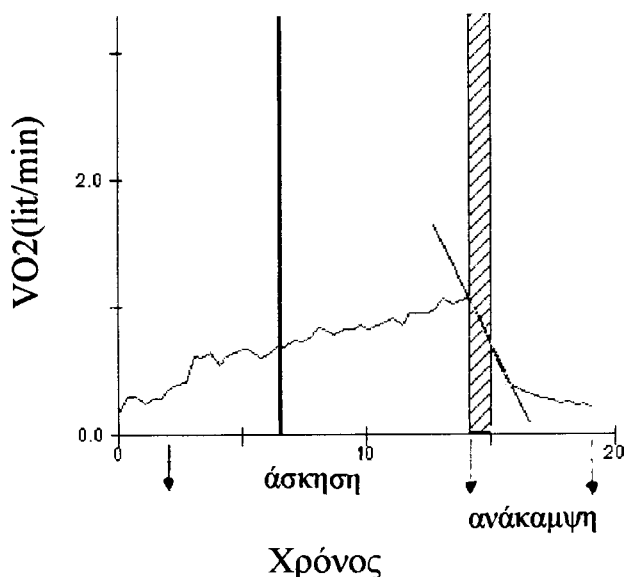
Ο αερόβιος ουδός (AT) υπολογίστηκε με τη μέθοδο V-slope<sup>8</sup> και το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε με ταυτόχρονη γραφική παράσταση του αναπνευστικού ισοδυναμίου για το διοξείδιο ( $VE/VCO_2$ ) και το οξυγόνο ( $VE/VO_2$ ) σε σχέση με τον χρόνο.

Για την εκτίμηση της κινητικής του οξυγόνου κατά την ανάκαμψη υπολογίστηκε με γραμμική παλινδρο-

μηση, χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό, η κλίση της καμπύλης κατανάλωσης του οξυγόνου για το πρώτο λεπτό της ανάκαμψης<sup>9</sup>, με την παραδοχή ότι η πτώση της κατανάλωσης του οξυγόνου στην πρώιμη φάση της ανάκαμψης είναι γραμμική (Σχ. 1). Το πρώτο λεπτό επελέγη για να εξασφαλισθεί ότι οι μετρήσεις αντανακλούν την ταχεία συνιστώσα του χρέους οξυγόνου<sup>5</sup>. Από όλους τους ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες ζητήθηκε να συνεχίσουν την άσκηση μέχρις εξάντλησεως των δυνάμεών τους.

### Στατιστική ανάλυση:

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή και σταθερά απόκλιση. Χρησιμοποιήθηκε t-test για τη σύγκριση των ασθενών με κυστική ίνωση με τους υγιείς μάρτυρες. Ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων της κινητικής του οξυγόνου και να εκτιμηθεί η συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων της κινητικής του οξυγόνου και της βαρύτητας της νόσου. Χρησιμοποιήθηκε πολυπαραγοντική γραμμική ανάλυση εξαρτήσεως, για να εκτιμηθεί η ανεξάρτητη σχέση των δεικτών της κινητικής του οξυγόνου με την βαρύ-



Σχήμα 1. Η κατανάλωση οξυγόνου κατά την ηρεμία, την άσκηση και την ανάκαμψη. Μείγστη κατανάλωση οξυγόνου (ο μέσος όρος τα τελευταία 20 δευτερόλεπτα της άσκησης), η κλίση της μείωσης της κατανάλωσης οξυγόνου κατά την πρώιμη φάση της ανάκαμψης (το πρώτο λεπτό).

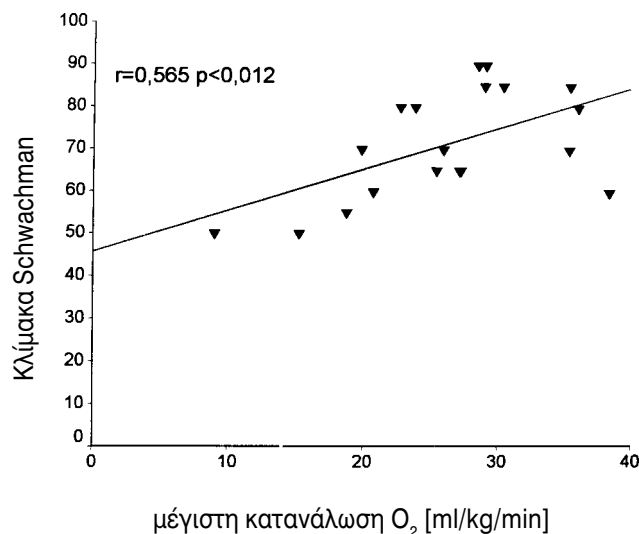
τητα της νόσου.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο πίνακας 2 δείχνει τα αποτελέσματα της ΚΑΔΚ. Η μέση τιμή της  $VO_2$  peak των ασθενών με κυστική ίνωση ήταν  $24.8 \pm 7.3$  (Εύρος: 8.5 to 36.1) στατιστικώς σημαντικά μικρότερη από εκείνη των υγιών μαρτύρων και παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την κλίμακα Schwachman (Σχ. 2). Στους ασθενείς με κυστική ίνωση ο απλός συντελεστής συσχέτισης (Pearson) του  $FEV_1$  με την κλίμακα Schwachman ήταν 0,70 ( $p < 0.001$ ) (Σχ. 3). Η κλίση  $VO_2/t$  παρουσίασε στενή συσχέτιση με την  $VO_2$  peak ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.001$ ) (Σχ. 4) καθώς επίσης και με το SS ( $r = 0.76$ ,  $p < 0.001$ ) (Σχ. 5). Σε πολυπαραγοντική ανάλυση χρησιμοποιήσαμε την κλίμακα Schwachman ως εξαρτημένη μεταβλητή και ως ανεξάρτητες μεταβλητές τις  $VO_2$  peak, AT,  $FEV_1$  την κλίση  $VO_2/t$  κατά την πρώιμη φάση της ανάκαμψης. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η μόνη μεταβλητή, που παρουσίαζε ανεξάρτητη συσχέτιση με την κλίμακα Schwachman ήταν η κλίση  $VO_2/t$  ( $F:37$ ,  $p < 0.001$ ). Πολυπαραγοντική ανάλυση συσχέτισης έδειξε ότι η συσχέτιση της κλίμακας Schwachman με την κλίση  $VO_2/t$  κατά την πρώιμη ανάκαμψη είναι ανεξάρτητη ( $r = 0.76$ ,  $p < 0.001$ ) από την  $VO_2$  peak.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν στατιστι-



Σχήμα 2. Συσχέτιση κλίμακας Schwachman με την μέγιστη κατανάλωση οξυγόνου σε ενήλικες ασθενείς με κυστική ίνωση.

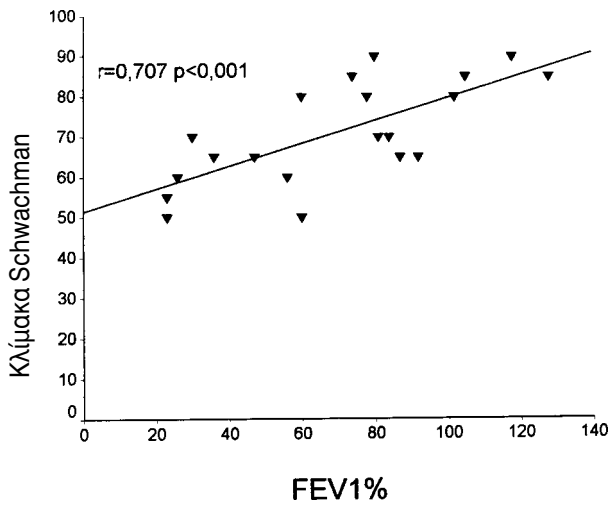
κά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της βαρύτητας της νόσου και της κινητικής του οξυγόνου κατά την πρώιμη φάση της ανάκαμψης.

Παράταση της κινητικής της κατανάλωσης του οξυγόνου κατά την ανάκαμψη έχει παρατηρηθεί και σε άλλες καταστάσεις, όπως η κακή φυσική κατάσταση<sup>10</sup>, η καρδιακή ανεπάρκεια<sup>11</sup> και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια<sup>12</sup>. Το φαινόμενο αυτό δεν είναι πλήρως κατανοητό, φαίνεται όμως πως σχετίζεται εν μέρει με την επιβράδυνση της αποκατάστασης των ενεργειακών αποθεμάτων των περιφερικών σκελετικών

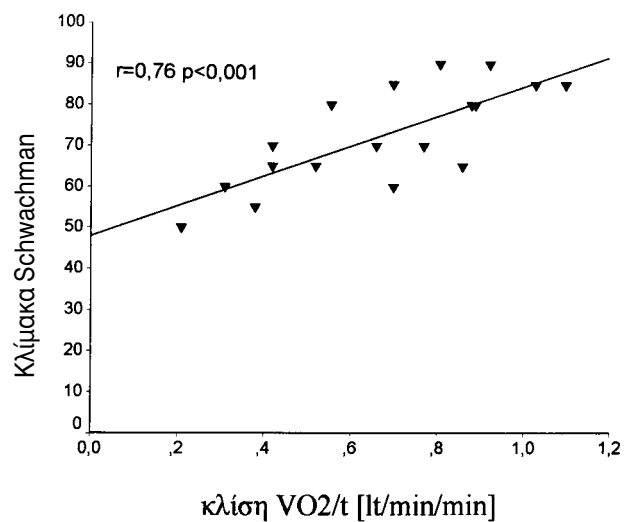
Πίνακας 2. Παράμετροι καρδιοαναπνευστικής δοκιμασίας κοπώσεως (ΚΑΔΚ) των ασθενών με κυστική ίνωση και των υγιών μαρτύρων

Παράμετροι ΚΑΔΚ	Ασθενείς		Υγιείς μάρτυρες	
	x	sd	x	sd
$VO_2$ peak (ml/kg/min)	24,8	7,3	35.4	7.3
$T_{1/2}$ της $VO_2$ (min)	1.3	0.8	1.02	0.2
Αναερόβιος ουδός (ml/kg/min)	20,5	5	24.7	5.3
Κλίση- $VO_2/t$ (l/min <sup>2</sup> )	0.61	0,31	1,1	0.13
METS	8,7	2,9	13.3	2.4
f peak	37	5	44	7
$V_E$ peak (l/min)	62.7	19.2	83.9	15.02
Κλίση- $V_E/VO_2$	24.3	4.8	1.1	0.2
Κλίση- $V_E/VCO_2$	28.4	5.9	26.6	3.14
Κλίση-HR/ $VO_2$ (παλμοί/l/min)	3.1	1.4	2.8	0.91

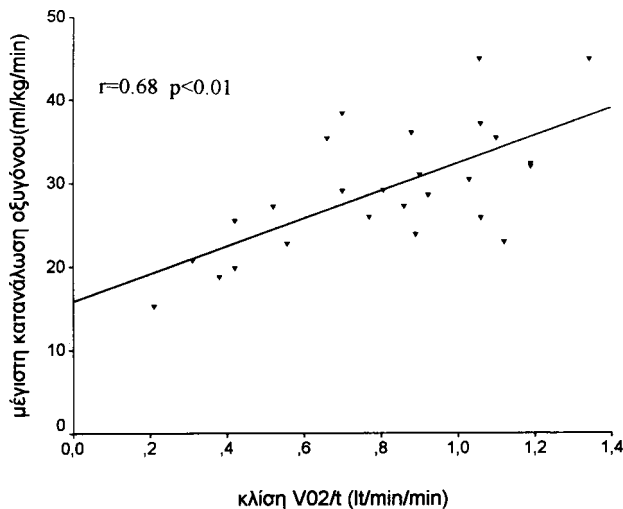




Σχήμα 3. Συσχέτιση κλίμακας Schwachman με τον βίαια εκπνεόμενο όγκο στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV<sub>1</sub>) σε ενήλικες ασθενείς με κυστική ίνωση.



Σχήμα 5. Συσχέτιση κλίμακας Schwachman με την κλίση μείωσης κατανάλωσης οξυγόνου κατά την πρώιμη φάση της ανάκαμψης (το πρώτο λεπτό) σε ενήλικες ασθενείς με κυστική ίνωση.



Σχήμα 4. Συσχέτιση μέγιστης κατανάλωσης οξυγόνου με την κλίση μείωσης κατανάλωσης οξυγόνου κατά την πρώιμη φάση της ανάκαμψης (το πρώτο λεπτό) σε ενήλικες ασθενείς με κυστική ίνωση.

μυών<sup>13</sup>.

Γενικά η αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου οφείλεται είτε σε αυξημένη χρησιμοποίηση ATP είτε σε ελαττωμένη αποτελεσματικότητα της παραγομένης ATP<sup>14</sup>.

Οι de Meer και συν.<sup>15</sup> χρησιμοποιώντας <sup>31</sup>P-NMR φασματοσκοπία διεπίστωσαν μεταβολές των επιπέδων των φωσφορικών και της φωσφοκρεατίνης καθώς και ελαττωμένη αποτελεσματικότητα της οξειδωτικής σύν-

θεσης ATP κατά την άσκηση του βραχιονίου μυός σε ασθενείς με κυστική ίνωση.

Εξάντληση της ATP και της φωσφοκρεατίνης κατά την άσκηση, ακολουθούμενη από καθυστερημένη αποκατάσταση της φωσφοκρεατίνης μπορεί να οφείλεται στη συμμετοχή κατά την άσκηση διαφορετικού τύπου μυικών ινών<sup>14,16</sup> με διαφορετικές μεταβολικές ιδιότητες, δηλαδή τις τύπου I (οξειδωτικές) και τύπου II (γλυκολυτικές) μυικές ίνες<sup>17,18</sup>. Οι γλυκολυτικές ίνες χρησιμοποιούν την αναερόβια γλυκόλυση και συνεπώς το περιεχόμενο ποσό της ATP και της φωσφοκρεατίνης εξαντλείται ταχέως κατά την άσκηση<sup>18</sup>, ακολουθούμενη από καθυστερημένη αποκατάσταση της φωσφοκρεατίνης<sup>19</sup>, ανάλογη της οξειδωτικής ικανότητας<sup>20</sup>.

Αυξημένη χρησιμοποίηση της ATP μπορεί να είναι αποτέλεσμα βιοχημικών παραγόντων, που δεν σχετίζονται με την διαδικασία της μυικής συστολής<sup>14</sup>. Μελέτες που έγιναν σε ινοβλάστες και λευκοκύτταρα ασθενών με κυστική ίνωση έδειξαν μιτοχονδριακές ανωμαλίες, όπως αυξημένη συγκέντρωση ασβεστίου<sup>21</sup>, μειωμένη δραστηριότητα της NADH<sup>22</sup> και υψηλότερο άριστο pH για τη δράση της NaOH<sup>23</sup>.

Οι O'Rawe και συν.<sup>24</sup> ανέφεραν συσχέτιση μεταξύ της κύριας μετάλλαξης της κυστικής ίνωσης και της αυξημένης κατανάλωσης ενέργειας και υπέθεσαν ότι μία παθολογική σύνδεση της ATP στο αλλήλιο ΔF<sub>508</sub>

της CFTR μπορεί να εμποδίζει την κατάλληλη σύνδεση της ATP, που απαιτείται για την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Οι μεταβολές αυτές ενδεχομένως επηρεάζουν τον μεταβολισμό των μυών και προκαλούν παράταση της αποκατάστασης της  $VO_2$ .

Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η παράταση της κινητικής του οξυγόνου κατά την πρώιμη φάση της

ανάκαμψης μετά από μέγιστη ΚΑΔΚ σχετίζεται με την βαρύτητα της νόσου. Η κλίση  $VO_2/t$  αποτελεί τον μόνο ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη της κλίμακας Schwachman. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να διερευνηθεί η κλινική σημασία και η προγνωστική του αξία.

## SUMMARY

### *Early recovery oxygen kinetics after maximal exercise is related to disease severity in adult patients with cystic fibrosis*

*E. Poulidou, S. Nanas, A. Papamichalopoulos, A Samakovli, Th. Kyprianou, M. Dimitriou, I. Mavrou, G. Perpati, V. Kotsovoulou, Ch. Roussos*

*Maximum oxygen consumption ( $VO_2$  peak) during cardiopulmonary exercise test (CPET) is commonly used to assess working capacity in patients with cystic fibrosis (CF). The determinants of oxygen consumption after exercise in these patients are unknown. We assessed indices of oxygen kinetics during CPET and early recovery and explored their relation to disease severity measured by Schwachman's score (SS). Nineteen patients with CF (10 male/9female, aged  $24 \pm 13$ , SS  $71 \pm 14$ ) and 11 healthy subjects (3 male / 8 female aged  $29 \pm 4$ ) underwent a maximum CPET on a treadmill. Breath by breath analysis was used for measuring oxygen consumption ( $VO_2$ ), carbon dioxide production ( $VCO_2$ ) and ventilation. Maximum oxygen consumption ( $VO_2$  peak) and early recovery first degree slope ( $VO_2/t$ -slope) for  $VO_2$  were calculated.*

*Peak oxygen consumption was significantly lower in CF patients compared to healthy subjects ( $21 \pm 8$  vs  $35 \pm 8$  ml/kg/mI  $p < 0.01$ ). In the CF group,  $VO_2/t$ -slope correlated to  $VO_2$  peak ( $r = 0.92$ ,  $p < 0.001$ ), as well as to SS ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.001$ ). We conclude that in CF patients, the prolonged oxygen kinetics during early recovery from maximal exercise is related to the disease severity. **Pneumon 2000, 13 (2): 137-143***

**Key words:** Cystic fibrosis, exercise, oxygen kinetics, Schwachman score

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Collins FS. Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. Science, 1992, 159:37-48.
- Welsh M, Anderson M, Rich DP et al. Cystic Fibrosis, CFTR, and Abnormal Electrolyte Transport. In: Cystic Fibrosis. Davis PB (ed) Marcel Dekker Vol 64 1993 New York.
- Webb AK, Dodd ME. Exercise and cystic fibrosis. J R Soc Med 1995, 88(Suppl 25):30-36.
- Schwachman H, Kulczycki L. Long-Term study of one hundred five patients with cystic fibrosis. Am J Dis Child 1958, 96:6-15.
- Margaria R, Edwards HT, Dill DB. The possible mechanisms of contracting and paying the oxygen debt and the role of lactic acid in muscular contraction. Am J Physiol 1933, 106:689-715.
- American Thoracic Society. Single breath carbon monoxide diffusing capacity. Recommendations for a standard technique. Am Rev Respir Dis 1987, 136: 1299-1307.
- Borg GA. Physiological basis of perceived exertion. Med Sci Sports Exerc 1982, 14:377-381.
- Beaver WL, Wasserman K, Whipp BJ. A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. J Appl Physiol 1986, 60:2020-2027.
- S. Nanas, J. Nanas, Ch. Kassiotis et al. Respiratory muscles performance is related to oxygen kinetics dur-

- ing maximal exercise and early recovery in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1999, 100:503-508.
10. Convertino VA, Goldwater DJ, Sandder H.  $VO_2$  kinetics of constant-load exercise following bed-rest-induced deconditioning. *J Appl Physiol* 1984, 57:1545-1550.
  11. Cohen-Solal Alain et al. Prolonged kinetics of recovery of oxygen consumption after maximal graded exercise in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1995, 91:2924-2932.
  12. Chick TW, Cagle TG, Vegas FA, Poliner JK, Murata GH. Recovery of gas exchange variables and heart rate after maximal exercise in COPD. *Chest* 1990, 97:276-279.
  13. Harris RC, Edwards RHT, Hultman E, Nordesjo LO, Nyland B, Sahlin K. The time course of phosphoryl-creatine resynthesis during recovery of the quadriceps muscle in man. *Pflugers Arch* 1976, 367:137-142.
  14. Bahr R, Opstad PK, Medbo JJ, Sejersted OM. Strenuous prolonged exercise elevates resting metabolic rate and causes reduced mechanical efficiency. *Acta Physiol Scand* 1991, 141:555-563.
  15. K de Meer, JAL Jeneson, VAM Gulmans, J van der Laag, R Berger. Efficiency of oxidative work performance of skeletal muscles in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1995, 50:980-983.
  16. Tomoko Kutsuzawa, Sumie Shioya, Daisaku Kurita et al.  $^{31}P$ -NMR study of skeletal muscle metabolism in patients with chronic respiratory impairment. *Am Rev Respir Dis* 1992, 146:1019-1024.
  17. Achten E, van Caueren M, Willem R, et al.  $^{31}P$ -NMR spectroscopy and metabolic properties of different muscle fibers. *J Appl Physiol* 1990, 68:644-649.
  18. Park JH, Brown RL, Park CR, et al. Functional pools of oxidative and glycolytic fibers in human muscle observed by  $^{31}P$  magnetic resonance spectroscopy during exercise. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:8976-80.
  19. Tesh PA, Thorsson A, Fujitsuka N. Creatine phosphate in fiber types of skeletal muscle before and after exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 1989, 66(4):1756-1759.
  20. Taylor DJ, Bore PJ, Styles P, et al. Bioenergetics of intact human muscle. A  $^{31}P$  nuclear magnetic resonance study. *Mol Biol Med* 1983, 1:77-94.
  21. Shapiro BL. Evidence for a mitochondrial lesion in cystic fibrosis. *Life Sci* 1989, 44:1327-34.
  22. Dehecchi MC, Girella E, Cabrini G, Berton G. The Km of NADH dehydrogenase is decreased in mitochondria of cystic fibrosis cells. *Enzyme* 1988, 40:45-50.
  23. Shapiro BL, Feigal RJ, Lam LFH. Mitochondrial NADH dehydrogenase in cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, 76:2979-83.
  24. O'Rawe A, Dodge JA, Redmond AOB et al. Genenergy interaction in cystic fibrosis. *Lancet* 1990, 3:552-553.

## Αλλάξτε διεύθυνση;

Προκειμένου η αποστολή του περιοδικού μας να συνεχισθεί χωρίς προβλήματα, παρακαλούμε ενημερώστε έγκαιρα τη γραμματεία.

Διεύθυνση Γραμματείας: Κτίριο Νοσηλευτικής Σχολής ΝΝΘΑ, Μεσογείων 152, Αθήνα. Τηλέφωνο και fax (01) 7487.723 (κ. Εύη Γιαννακού)

# Τα επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου στον εκπνεόμενο αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες: Σχέση με τη φλεγμονή και τη βαρύτητα και έκταση της νόσου

Σ. Λουκίδης<sup>1</sup>  
Δ. Μπούρος<sup>2</sup>  
Γ. Παπαθεοδώρου<sup>1</sup>  
Σ. Λάχανης<sup>3</sup>  
Π. Πανάγου<sup>1</sup>  
Ν. Καλογερόπουλος<sup>1</sup>  
Ν. Σιαφάκας<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Πνευμονολογική Κλινική και Εργαστήριο Κλινικής Έρευνας 401 ΓΣΝΑ Αθήνα, <sup>2</sup>Πανεπιστήμιο Κρήτης, Πνευμονολογική Κλινική, Ηράκλειο, <sup>3</sup>Τμήμα Υπολογιστικής Τομογραφίας 401 ΓΣΝΑ Αθήνα.

**Λέξεις κλειδιά:** Βρογχεκτασίες, οξειδωτική φλεγμονή, σπιρομέτρηση, αξονική τομογραφία, πολυμορφοπύρηνα

Αλληλογραφία:  
Στέλιος Λουκίδης, Σμόλικα 2, Αθήνα 1667, Τηλ. 8954603, Fax. 7494095, E-mail: ssat@hol.gr

Η εργασία παρελήφθη στις 19/1/2000 και εγκρίθηκε προς δημοσίευση στις 18/5/2000.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) έχει προταθεί ως δείκτης φλεγμονής των αεραγωγών σε διάφορες πνευμονικές παθήσεις συμπεριλαμβανομένων των βρογχεκτασιών. Ο ρόλος του όμως εξακολουθεί να παραμένει αδιευκρίνιστος, εξ αιτίας της απουσίας ειδικών συσχετίσεων με φλεγμονώδεις παράγοντες που προέρχονται από βιοψικά υλικά ή από υλικά μελέτης κυτταρικού πληθυσμού. Μελετήσαμε τα επίπεδα του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα 30 ασθενών με βρογχεκτασίες (24 άνδρες, ηλικίας  $39 \pm 12.5$  έτη,  $FEV_1$   $69 \pm 12.4\%$  αναμ.), ερευνώντας την πιθανή συσχέτισή τους με την έκταση της νόσου, όπως αυτή καθορίσθηκε με την υψηλής διακριτικότητας αξονική τομογραφία (HRCT), τη σπιρομέτρηση, καθώς και την σύνθεση του κυτταρικού πληθυσμού μετά προκλητή απόχρεμψη. Στους ίδιους ασθενείς μελετήθηκαν οι ίδιες παράμετροι, μεταξύ αυτών που ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή συγκριτικά με αυτούς που δεν ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή. Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα συγκρινόμενα με αυτά 15 φυσιολογικών ατόμων (12 άνδρες, ηλικίας  $34 \pm 12.4$  έτη,  $FEV_1$   $95 \pm 12.3\%$  αναμ.) ( $1.1 \pm 12.0.1 \mu M$  έναντι  $0.3 \pm 12.0.04 \mu M$ ,  $p < 0.0001$ ). Παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ  $H_2O_2$ , του επί % αριθμού των πολυμορφοπυρηνών στην προκλητή απόχρεμψη και της έκτασης της νόσου όπως αυτή καθορίσθηκε με το σύστημα βαθμολόγησης της HRCT ( $r = 0.9$ ,  $p < 0.0001$  και  $r = 0.66$ ,  $p < 0.0001$  αντίστοιχα). Βρέθηκε ακόμα μία στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ  $H_2O_2$  και  $FEV_1$ , % αναμ. ( $r = -0.42$ ,  $p < 0.05$ ). Οι ασθενείς που ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή σε σύγκριση με τους μη λαμβάνοντες στεροειδή, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τα επίπεδα του  $H_2O_2$  ( $1.15 \pm 12.0.15 \mu M$  έναντι  $1.02 \pm 12.0.1 \mu M$ ,  $p = 0.12$ ).

**Συμπερασματικά, η μελέτη των επιπέδων του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης φλεγμονής των αεραγωγών, έκτασης της νόσου και εν μέρει της βαρύτητας απόφραξης των αεραγωγών. Πνεύμων 2000, 13 (2): 144-153**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βρογχεκτασίες αποτελούν μία χρόνια νόσο των αεραγωγών που χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη διάταση των βρόγχων και μόνιμη παραγωγή βλεννοπυώδους απόχρεμψης. Σε ασθενείς με βρογχεκτασίες έχουν μετρηθεί υψηλά επίπεδα κυτταροκινών στις βρογχικές εκκρίσεις, ενώ τα πολυμορφοπύρηνα θεωρούνται ως τα επικρατούντα κύτταρα στην φλεγμονή των αεραγωγών<sup>1</sup>. Η βλάβη των αεραγωγών θεωρείται ότι οφείλεται σε παρατεταμένη απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών που προέρχονται από τα πολυμορφοπύρηνα, ως απάντηση στις επαναλαμβανόμενες βακτηριδιακές λοιμώξεις<sup>2</sup>. Η αξιολόγηση και παρακολούθηση των ασθενών γίνεται με τις λειτουργικές δοκιμασίες του αναπνευστικού, με κυριότερο εκπρόσωπο την απλή σπιρομέτρηση, καθώς και με την υψηλής διακριτικότητας αξονική τομογραφία (HRCT), παρ'ότι η τελευταία απαιτεί έκθεση σε ακτινοβολία<sup>3</sup>. Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη συσχέτιση συστηματικών δεικτών φλεγμονής-που μετρήθηκαν στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), στον ορό ή στον εκπνεόμενο αέρα- με την έκταση της νόσου, τις λειτουργικές δοκιμασίες, τη σύνθεση και την ποσότητα των πτυέλων καθώς και την ποιότητα ζωής των ασθενών<sup>4,6</sup>.

Μέσω της διαδικασίας της βρογχοσκόπησης, η φλεγμονή των αεραγωγών αξιολογείται με την κυτταρολογική και βιοχημική ανάλυση του BAL ή με την μελέτη βιοψικού υλικού. Εξ αιτίας όμως του επεμβατικού χαρακτήρα της, η βρογχοσκόπηση δεν θεωρείται η κατάλληλη μέθοδος για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Η πρόσφατη έρευνα θεωρεί ότι η προκλητή απόχρεμψη αποτελεί μία αξιόπιστη, μη επεμβατική και εύκολη μέθοδο για την αξιολόγηση της φλεγμονής των αεραγωγών<sup>7</sup>. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε σοβαρές καταστάσεις, ενώ είναι ευκόλως επαναλαμβανόμενη, με μεγάλη αξία στην έρευνα της φλεγ-

μονώδους διεργασίας, καθώς και στην θεραπευτική αξιολόγηση των διαφόρων πνευμονικών παθήσεων<sup>8</sup>.

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) αποτελεί ένα σημαντικό οξειδωτικό μόριο που προκαλεί κυτταρική βλάβη. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> έχει προταθεί ως δείκτης φλεγμονής σε διάφορες πνευ-

μονικές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένων των βρογχεκτασιών<sup>9-12</sup>. Παρά όμως την εκτεταμένη κλινική και εργαστηριακή του διερεύνηση, δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι σχετίζεται με τη διαδικασία της φλεγμονής των αεραγωγών. Αυτό οφείλεται κυρίως στην απουσία συσχετίσεων μεταξύ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και δεικτών φλεγμονής που να προέρχονται από βιοψικά υλικά ή από την μελέτη κυτταρικού πληθυσμού των αεραγωγών.

Με βάσει την παραπάνω υπόθεση, μελετήσαμε τα επίπεδα του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες, ερευνώντας συγχρόνως την ύπαρξη πιθανής συσχέτισης μεταξύ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, έκτασης της νόσου, λειτουργικών δοκιμασιών και κυτταρικού πληθυσμού από την προκλητή απόχρεμψη. Τέλος, οι ίδιες παράμετροι συγκρίθηκαν μεταξύ ασθενών που ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή και αυτών που δεν ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή.

## ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Μελετήθηκαν 15 φυσιολογικά άτομα (12 άνδρες, ηλικία 34 ± 4 έτη) (Πίνακας 1). Όλοι ήταν μη καπνιστές και δεν παρουσίαζαν λοίμωξη αναπνευστικού επί τουλάχιστο έξι εβδομάδες πριν από την συμμετοχή τους στη μελέτη. Δεν είχαν ιστορικό χρόνιας νόσου και δεν ελάμβαναν χρόνια φαρμακευτική αγωγή. Όλοι οι ασθενείς παρουσίαζαν αρνητική δοκιμασία ορού για παρουσία ατοπίας (phadiatop test). Όλοι είχαν φυσιολογική σπιρομέτρηση (FEV<sub>1</sub> 95 ± 3 % αναμ. και FVC 97 ± 5 % αναμ.) και δεν παρουσίαζαν βρογχική υπεραντιδραστικότητα, όπως αυτή μετρήθηκε με δοκιμασία πρόκλησης με ισταμίνη (PD<sub>20</sub> >0.800mg).

Τριάντα ασθενείς (24 άνδρες, ηλικίας 39 ± 2.5 έτη, FEV<sub>1</sub> 69 ± 4 % αναμ.) με διαγνωσμένες βρογχεκτασίες επιλέχθηκαν από τα εξωτερικά ιατρεία του 401 ΓΣΝΑ. Η διάγνωση των ασθενών βασίστηκε σε κλινικά και ακτινολογικά κριτήρια, ενώ τεκμηριώθηκε με

Πίνακας 1. Υλικό μελέτης

	Ασθενείς με βρογχεκτασίες	Φυσιολογικά άτομα
	(n=30)	(n=15)
Φύλο Α/Γ	24/6	12/3
Ηλικία	39 ± 3	34 ± 2
FEV <sub>1</sub> % αναμ.	69.5 ± 4	95 ± 3
FVC % αναμ.	78 ± 2	97 ± 5
Βαθμολογία HRCT	9.5 ± 0.8	Δεν έγινε

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ± SEM.

HRCT. Οι ασθενείς συμμετείχαν στην μελέτη μόνο αν ήταν σε σταθερή κλινική κατάσταση και δεν παρουσίαζαν λοίμωξη του ανώτερου ή κατώτερου αναπνευστικού επί τουλάχιστον 4 εβδομάδες πριν την μελέτη. Οι βρογχεκτασίες θεωρήθηκαν μεταφυματιώδεις σε έναν ασθενή, λόγω πρωτοπαθούς δυσκινησίας των κροσσών σε τρεις ασθενείς, σύνδρομο Young σε ένα, ανεπάρκεια υποκλάσματος IgG σε δύο ασθενείς, ανεπάρκεια IgA σε έναν ασθενή, ενώ στους εναπομείναντες είκοσι-δύο, λόγω μη ανευρέσεως προφανούς αιτίας, εδόθη ο χαρακτηρισμός ιδιοπαθής. Όλοι οι ασθενείς σε ανάλογη χρονική περίοδο είχαν ελεγχθεί για ύπαρξη ινοκυστικής νόσου με αρνητικά αποτελέσματα. Ασθενείς με βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση, άσθμα και αποπία αποκλείστηκαν από την μελέτη. Κανένας από τους ασθενείς δεν ήταν καπνιστής, ενώ δύο από αυτούς είχαν σταματήσει το κάπνισμα από 3ετίας (ιστορικό κάπνισματος < 4 pack-years). Είκοσι ένας ασθενείς ελάμβαναν β<sub>2</sub> διεγέρτες, 2 ελάμβαναν βρωμιούχο ιπρατρόπιο, ενώ 14 ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή (προπιονική φλουτικασόνη 500-1000μg ή βουδεσονίδη 400-800 μg ημερησίως). Κανείς ασθενής δεν ελάμβανε βλεννολυτικά ή ευρίσκετο σε χρόνια οξυγονοθεραπεία. Κανείς ασθενής δεν είχε αναστρεψιμότητα στην σπιρομέτρηση (αύξηση της FEV<sub>1</sub> τριάντα λεπτά μετά από εισπνοή 200μg σαλβουταμόλης <10%).

### Σχεδιασμός μελέτης

Σε όλα τα φυσιολογικά άτομα ελήφθη ιατρικό ιστορικό, έγινε φυσική εξέταση, σπιρομέτρηση και δοκιμασία βρογχικής πρόκλησης με ισταμίνη. Μετά από την διενέργεια της σπιρομέτρησης, έγινε η συλλογή του

εκπνεόμενου αέρα. Τριάντα λεπτά αργότερα η σπιρομέτρηση επαναλήφθηκε και εφ' όσον δεν παρουσίαζε μεταβολές, ακολούθουσε η διαδικασία της προκλητής απόχρεμψης. Ο ερευνητής που έκανε τις μετρήσεις του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> καθώς και ο ερευνητής που ανέλυε τα ευρήματα της προκλητής απόχρεμψης δεν γνώριζαν την κλινική και λειτουργική εικόνα ούτε των ασθενών ούτε των φυσιολογικών ατόμων.

### Λειτουργικές δοκιμασίες

Η μέτρηση της FEV<sub>1</sub> και FVC έγινε με σπιρόμετρο Vica-test, Mighard, NL. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η καλύτερη προσπάθεια από τρεις εκφραζόμενη σε % της αναμενομένης. Η βρογχική υπεραντιδραστικότητα μετρήθηκε με δοκιμασία πρόκλησης με ισταμίνη χρησιμοποιώντας το σύστημα APS Jaeger, Würzburg, Germany με νεφελοποιητή Sandoz (Jaeger). Η PD<sub>20</sub> μετρήθηκε ως η δόση ισταμίνης που προκαλεί πτώση της FEV<sub>1</sub> κατά 20%.

### Υψηλής διακριτικότητας αξονική τομογραφία

Οι 30 ασθενείς υπεβλήθησαν σε HRCT (GE 9800 Highlight advanced) με χρονικό όριο τις 10 ημέρες από την συμμετοχή στην μελέτη. Η HRCT αξιολογήθηκε και βαθμολογήθηκε από τον ίδιο ακτινολόγο ο οποίος δεν γνώριζε στοιχεία από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Και στους δύο πνεύμονες κάθε λοβός αξιολογήθηκε για βρογχεκτασικές αλλοιώσεις με σύστημα βαθμολόγησης από 0-3 (η γλωσσίδα βαθμολογήθηκε ως ξεχωριστός λοβός). Μέγιστη βαθμολογία ήταν 18 βαθμοί (0= καμμία αλλοίωση 1=συμμετοχή ενός υποπηματικού, 2=συμμετοχή περισσότερο από ένα υποπηματικό, 3=παρουσία κυστικών βρογχεκτασιών). Η παραπάνω αξιολόγηση είναι απόλυτα τεκμηριωμένη στην βιβλιογραφία και συνοδεύεται από χαμηλή παρέκλιση<sup>3,5</sup>. Στο διάστημα των 10 ημερών κανείς ασθενής δεν παρουσίασε μεταβολές της κλινικής του κατάστασης ή της σπιρομέτρησης.

### Συλλογή συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα και μέτρηση υπεροξειδίου του υδρογόνου

Η συλλογή του συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα έγινε σε πρωινές ώρες χρησιμοποιώντας μία εναλλακτική μέθοδο ψύξεως των σωλήνων. Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται για την πρόκληση με ψυχρό αέρα λει-

τούργησε στη συγκεκριμένη μέθοδο ως μέσο παραγωγής ψυχρού αέρα σε θερμοκρασίες  $-15^{\circ}\text{C}$  έως  $-18^{\circ}\text{C}$  με ροή αέρα 80λίτρα/λεπτό. Ένα διπλός γυάλινος σωλήνας μήκους 30 cm συνδέθηκε με το σημείο εξόδου του ψυχρού αέρα από το ένα άκρο, ενώ στο άλλο άκρο γινόταν η εκπνοή των ατόμων της μελέτης. Ο σωλήνας στο επάνω μέρος είχε μία βαλβίδα 2 κατευθύνσεων (Heins Rudolf) με σκοπό να ξεχωρίζει την εισπνοή από την εκπνοή. Όλοι οι συμμετέχοντες στην μελέτη, πριν ξεκινήσουν την διαδικασία συλλογής του συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα, έκαναν στοματοφαρυγγικές πλύσεις με νερό, ενώ η διαδικασία συλλογής έγινε σε καθιστική θέση με ήρεμη αναπνοή και επί χρονικό διάστημα 10 λεπτών. Το συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα συλλέχθηκε στο άκρο που ήταν συνδεδεμένο με το μηχάνημα του ψυχρού αέρα και άμεσα διατηρήθηκε στους  $-70^{\circ}\text{C}$  για την μετέπειτα επεξεργασία. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο τα πλεονεκτήματα είναι δύο: Πρώτον αποφεύγεται η ανάμειξη με σίελο λόγω του ότι η συλλογή γίνεται στο άλλο άκρο του σωλήνα που βρίσκεται 30 cm μακρύτερα από το στόμα του ασθενούς. Το δεύτερο είναι η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας ψύξεως του δείγματος μέσω του μηχανήματος του ψυχρού αέρα, σε σύγκριση με το μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενο πάγο των άλλων μεθόδων. Με την παραπάνω μέθοδο συλλέγεται τουλάχιστο 1ml εκπνεόμενου αέρα σε πλαστικό σωληνάριο χωρητικότητας 3ml. Η μέτρηση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  έγινε σε διάστημα 20 ημερών από την στιγμή της συλλογής. Οι μετρήσεις έγιναν σε 4 ομάδες (μικρότερος χρόνος μέτρησης 2 ημέρες –μεγαλύτερος χρόνος μέτρησης από την συλλογή 20 ημέρες). Όλα τα δείγματα ελέγχθησαν για την παρουσία σιέλου με την μέθοδο ανίχνευσης της αμυλάσης. Η ανίχνευση αμυλάσης έγινε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο το KONE Instr. Finland. Με αυτή την μέθοδο η αμυλάση του δείγματος και το ένζυμο α-γλυκοσιδάση υδρολύουν το υπόστρωμα π-νιτροφενυλο-α-δ μαλτοχεπταοσίδη σε γλυκόζη και π-νιτροφενόλη. Ακολουθεί η απελευθέρωση της π-νιτροφενόλης στα 405nm ( $37^{\circ}\text{C}$ ) για 2 λεπτά. Σε δύο δείγματα έγινε έγχυση σιέλου με σκοπό να ελεγχθεί η ευαισθησία της μεθόδου. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο που περιγράφηκε, δεν ανευρέθηκε αμυλάση σε κανένα από τα δείγματα της μελέτης. Στα δείγματα που έγινε έγχυση σιέλου ανευρέθη

αμυλάση > των 5000 IU. Η αναπαραγωγικότητα των επιπέδων του  $\text{H}_2\text{O}_2$  ελέγχθηκε σε 2 διαφορετικές ημέρες σε 5 φυσιολογικούς και σε δέκα ασθενείς που ελέγχθηκαν τυχαία. Για τον έλεγχο σταθερότητας του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν 8 άτομα (4 ασθενείς). Στα παραπάνω άτομα ελήφθησαν 4 ml δείγματος. Αυτή η ποσότητα χωρίστηκε σε 4 ίσα μέρη και η μέτρηση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  έγινε σε χρονικό διάστημα 2ημερών, 1 εβδομάδας, 2 εβδομάδων και 3 εβδομάδων που αποτελεί και το μέγιστο χρόνο μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα δείγματα.

Για την μέτρηση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  χρησιμοποιήθηκε η μέχρι τώρα αποδεκτή ενζυματική μέθοδος<sup>11,13</sup>. Περιληπτικά, 250 l από 420 M 3', 3,5,5' τετραμεθυλβενζιδίνη (διαλυμένη σε 0.42 M citrate buffer, pH 3.8) και 10 l από 52.5 U/ml horseradish περοξειδάση (HRP, Sigma Chemicals, St Louis, USA) αναμείχθηκαν με 250 l δείγματος εκπνεόμενου αέρα για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα αυτό οξειδώθηκε σε pH 1 με 10 l από 18 N σουλφουρικό οξύ. Το προϊόν μετατροπής προσδιορίστηκε ποσοτικά με απορρόφηση σε 450 nm χρησιμοποιώντας διπλό φασματοφωτόμετρο (Unicon 940, Kontron Instr.) και τελικά μετρήθηκε με αυτόματο αναλυτή (model EL 312 Biotec). Το κατώτερο όριο μέτρησης ήταν 0.1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### Προκλητή απόχρεμψη

Η προκλητή απόχρεμψη έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία<sup>14</sup>, λαμβάνοντας όλα τα προληπτικά μέτρα για την ασφάλεια της μεθόδου<sup>8</sup>. Χρησιμοποιήθηκε εισπνοή υπέρτονου φυσιολογικού ορού 3.5% με νεφελοποιητή DeVilbiss ultrasonic (2696 Somerset PA, USA). Σε ασθενείς και φυσιολογικούς ζητήθηκε να καθαρίσουν τις ρινικές τους εκκρίσεις και να κάνουν καλές στοματοφαρυγγικές πλύσεις με σκοπό να μειωθεί η πιθανότητα ανάμειξης του δείγματος πτυέλου με οπισθορινικές εκκρίσεις και σίελο. Κατά την διάρκεια της διαδικασίας όλα τα άτομα της μελέτης έφεραν ρινοπίεστρο. Σε όλους ζητήθηκε να βήχουν βαθιά με χρονικά διαλείμματα 2-3 λεπτών, ανάλογα φυσικά και με την λειτουργική βαρύτητα της νόσου. Το πρώτο δείγμα πτυέλων δεν χρησιμοποιήθηκε μιας και θεωρείται ότι περιέχει υψηλό ποσοστό πλακωδών κυττάρων<sup>15</sup>. Ελήφθησαν τουλάχιστον 2 ml προκλητής απόχρεμψης σε πλαστικό

σωληνάριο. Το δείγμα θεωρήθηκε αξιόπιστο εφόσον τα πλακώδη κύτταρα ήταν < 30% του συνόλου των φλεγμονωδών κυττάρων. Η διεργασία του δείγματος έγινε σε χρονικό διάστημα 2 ωρών από την συλλογή του. Εν συντομία περιγράφουμε την διαδικασία προετοιμασίας και ανάγνωσης του δείγματος. Αλατούχο διάλυμα Hanks' (HBSS 2ml) που περιείχε 1% διθειοτριόλη (DTT: Sigma Chemicals, St Louis, USA) αναμείχθηκε με το δείγμα πτυέλων. Κατόπιν ανακινήθηκε αρκετές φορές μέχρι την πλήρη ομογενοποίησή του. Ακολούθησε καταγραφή του όγκου του πτύελου και νέα ανάμειξη με το HBSS με σκοπό το συνολικό δείγμα να γίνει 10 ml. Ακολούθησε νέα ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 400 x g. Χρησιμοποιώντας ανάλογο μετρητή και μετά από χρώση με kimura έγινε η προετοιμασία του δείγματος για μέτρηση του συνολικού αριθμού των φλεγμονωδών κυττάρων. Τα τελικά δείγματα μετρήθηκαν μετά από χρώση με May-Grunwald-Giemsa. Χρησιμοποιήθηκαν 2 πλακίδια ενώ μετρήθηκαν τουλάχιστον 300 φλεγμονώδη κύτταρα. Όταν έγινε η μέτρηση της επί τοις εκατό ανάλυσης του κυτταρικού πληθυσμού δεν ήταν γνωστές οι τιμές του  $H_2O_2$ .

### Στατιστική ανάλυση

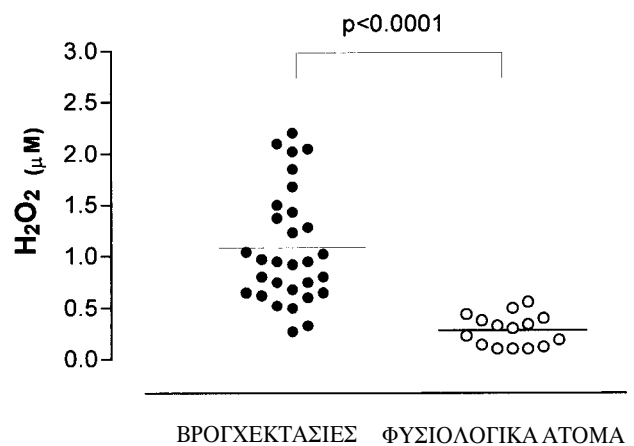
Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή SEM. Για την στατιστική σύγκριση των ομάδων χρησιμοποιήθηκε το student-t-test. Η στατιστική συσχέτιση έγινε με το σύστημα Spearman's rank correlation coefficients. Η αναπαραγωγικότητα των επιπέδων του  $H_2O_2$  καθώς και η σταθερότητα των δειγμάτων ελέγχθηκαν με την μέθοδο που έχει περιγραφεί στην βιβλιογραφία<sup>16</sup>. Το  $p < 0.05$  θεωρήθηκε ως στατιστικά σημαντικό.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο που περιγράφηκε για τον έλεγχο αναπαραγωγικότητας των μετρήσεων βρέθηκε ότι οι τιμές των δύο συνεχόμενων ημερών είχαν διαφορά 0.07 (SD 0.04) για τους ασθενείς και 0.03 (SD 0.02) για τους φυσιολογικούς. Ο έλεγχος σταθερότητας έδειξε ότι δεν καταγράφηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 4 μετρήσεων ( $0.62 \pm 0.41$  SD στις 2 ημέρες,  $p=0.67$ ,  $0.64 \pm 0.4$  SD μετά από 1 εβδομάδα,  $p=0.54$ ,  $0.635 \pm 0.4$  SD μετά από 2 εβδομάδες,

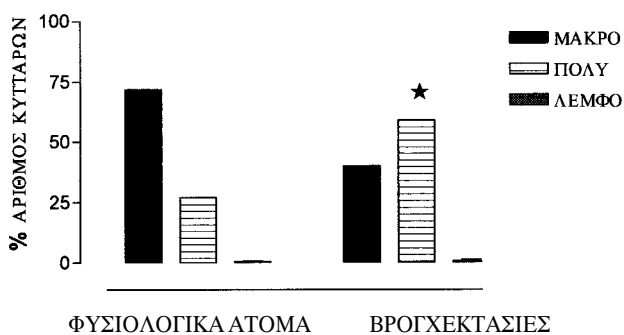
$p=0.60$ ,  $0.64 \pm 0.42$  SD μετά από 3 εβδομάδες,  $p=0.55$ ).

Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με βρογχεκτασίες συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ( $1.1 \pm 0.1$   $\mu M$  έναντι  $0.3 \pm 0.04$   $\mu M$  αντιστοίχως,  $p < 0.0001$ , Εικόνα 1). Ο ολικός αριθμός κυττάρων στην προκλητή απόχρεμψη ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς με βρογχεκτασίες σε σχέση με τους φυσιολογικούς ( $3.7 \cdot 10^6 ml^{-1}$  έναντι  $2.1 \cdot 10^6 ml^{-1}$ ,  $p < 0.001$ ). Ο επί τοις εκατό αριθμός των πολυμορφοκυττάρων, όπως αυτά αναλύθηκαν στην προκλητή απόχρεμψη, ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος στους βρογχεκτασιικούς ασθενείς συγκρινόμενα με τους φυσιολογικούς ( $59 \pm 3$  % έναντι  $27 \pm 1.5$  % αντιστοίχως  $p < 0.0001$ , εικόνα 2). Αντίθετα, οι φυσιολογικοί είχαν στατιστικά υψηλότερο αριθμό επί τοις εκατό μακροφάγων ( $72.5$  % έναντι  $40.3$  % αντιστοίχως  $p < 0.0001$ , εικόνα 2). Παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του  $H_2O_2$  στον εκπνεόμενο αέρα, του επί τοις εκατό αριθμού των πολυμορφοκυττάρων στην προκλητή απόχρεμψη και της έκτασης της νόσου ( $r=0.9$ ,  $p < 0.0001$ ,  $r=0.66$ ,  $p < 0.0001$  αντιστοίχως (Εικόνες 3A, 3B). Παρατηρήθηκε ακόμα μία στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της  $FEV_1$  % αναμ., των επιπέδων του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, του επί τοις εκατό αριθμού των πολυμορφοκυττάρων στην προκλητή απόχρεμψη και της έκτασης της νόσου ( $r=-0.42$ ,  $p < 0.05$ -εικόνα 3Γ,  $r=-$



Εικόνα 1. Επίπεδα υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με βρογχεκτασίες ( $n=30$ ) και φυσιολογικών ατόμων ( $n=15$ ),  $p < 0.0001$ .





Εικόνα 2. Ανάλυση κυτταρικού πληθυσμού σε προκλητή απόχρεμψη ασθενών με βρογχεκτασίες (n=30) και φυσιολογικών ατόμων (n=15). Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντικά υψηλότερο αριθμό σε σχέση με τους φυσιολογικούς,  $p < 0.0001$ .

0.39,  $p < 0.05$  και  $r = -0.48$ ,  $p < 0.05$ , αντιστοίχως). Παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του επί τοις εκατό αριθμού των πολυμορφοκυττάρων στην προκλητή απόχρεμψη και της έκτασης της νόσου ( $r = 0.6$ ,  $p < 0.0001$ ). Οι ασθενείς με βρογχεκτασίες παρουσίαζαν μία στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του επί τοις εκατό αριθμού των μακροφάγων και των επιπέδων του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα ( $r = -0.64$ ,  $p < 0.0001$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της FVC % αναμ., των επιπέδων του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, του επί τοις εκατό αριθμού των πολυμορφοκυττάρων στην προκλητή απόχρεμψη και της έκτασης της νόσου. Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  στους ασθενείς που ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτούς που δεν ελάμβαναν ανάλογη αγωγή ( $1.15 \pm 0.15 \mu M$  έναντι  $1.02 \pm 0.1 \mu M$  αντιστοίχως,  $p = 0.12$ ,

πίνακας 2). Στις δύο αυτές ομάδες αξιολογήθηκαν και οι άλλες παράμετροι της μελέτης χωρίς να προκύψουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (Πίνακας 2).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι οι ασθενείς με βρογχεκτασίες παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων του  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα. Η αύξηση αυτή σχετίζεται με την πολυμορφοκυτταρική φλεγμονή στην προκλητή απόχρεμψη, με την έκταση της νόσου καθώς και με την βαρύτητα της απόφραξης όπως αυτή ορίστηκε με την FEV<sub>1</sub> % αναμ.

Τα επίπεδα του  $H_2O_2$  που μετρήθηκαν σε φυσιολογικά άτομα είναι ανάλογα με αυτά που έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες<sup>9,17</sup>. Ανάλογες με προηγούμενη μέτρηση είναι και οι μετρήσεις του  $H_2O_2$  σε ασθενείς με βρογχεκτασίες<sup>12</sup>. Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την παρουσία οξειδωτικής φλεγμονής στον εκπνεόμενο αέρα ή και στο συμπύκνωμά του<sup>6,12,18</sup>. Η κύρια υπόθεση των μελετών αυτών βασιζόταν στην θεωρία ότι τα αυξημένα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου (NO), μονοξειδίου του άνθρακα (CO) και  $H_2O_2$  σχετίζονται άμεσα με την διαδικασία της φλεγμονής των αεραγωγών. Η υπόθεση όμως αυτή παρέμεινε αναπόδεικτη μιας και δεν είχαν χρησιμοποιηθεί οι ανάλογες μετρήσεις που θα επιβεβαίωναν αυτή την θεωρία. Με βάση τα προαναφερθέντα, τα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι τα πρώτα που επιβεβαιώνουν μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ υψηλών επιπέδων οξειδωτικών μορίων στον εκπνεόμενο αέρα και φλεγμονής των αεραγωγών σε ασθενείς με βρογχεκτασίες.

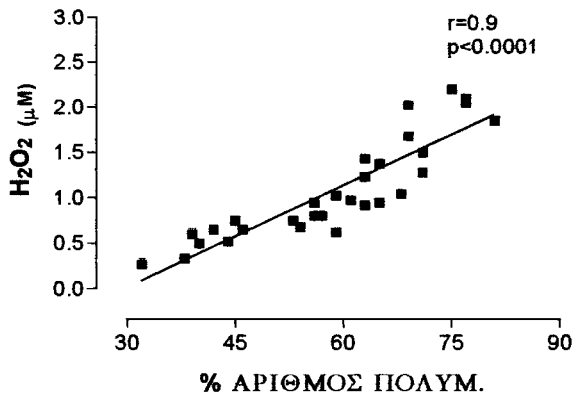
Τα μετροθέντα επίπεδα του  $H_2O_2$  είναι το αποτέλεσμα που προκύπτει μεταξύ της διαδικασίας παρα-

Πίνακας 2.  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, επί τοις εκατό αριθμός πολυμορφοκυττάρων στην προκλητή απόχρεμψη, FEV<sub>1</sub> % αναμ. και βαθμολογία σε HRCT σε ασθενείς με και χωρίς θεραπεία με εισπνεόμενα στεροειδή.

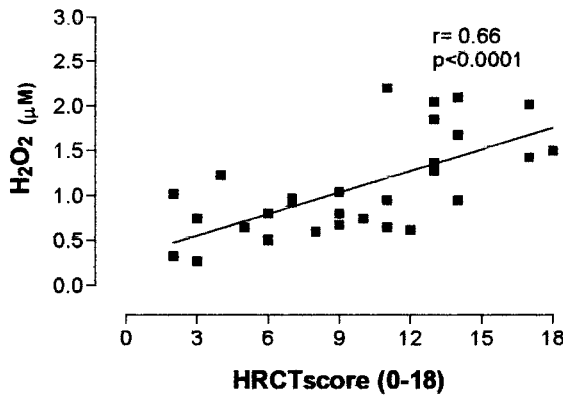
	Με εισπνεόμενα στεροειδή (n=14)	Χωρίς εισπνεόμενα στεροειδή (n=16)	P
$H_2O_2$ (μM)	1.15 ± 0.15	1.02 ± 0.1	NS
FEV <sub>1</sub> % αναμ.	70 ± 4	69 ± 5	NS
επί τοις εκατό αριθμός πολυμορφοκυττάρων	61 ± 3	56 ± 3	NS
Βαθμολογία HRCT	10 ± 1	9.1 ± 1	NS

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ± SEM.

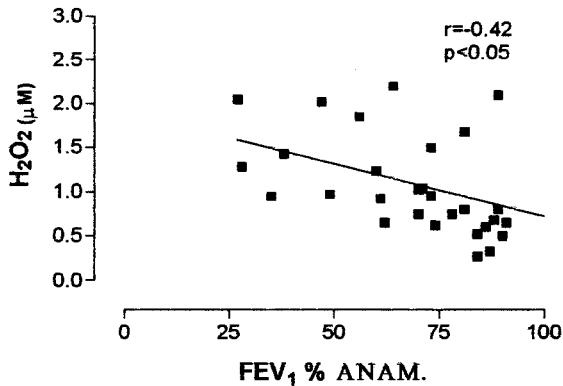
3A



3B



3Γ



Εικόνα 3Α. Συσχέτιση μεταξύ υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και του επί τοις εκατό αριθμού πολυμορφοκυττάρων στην προκλητή απόχρεμψη ( $r=0.9$   $p<0.0001$ ).

Εικόνα 3Β. Συσχέτιση μεταξύ υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και έκτασης της νόσου στην HRCT ( $r=0.66$   $p<0.0001$ ).

Εικόνα 3Γ. Συσχέτιση μεταξύ υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και  $FEV_1$  % αναμ. ( $r=-0.42$   $p<0.05$ ).

γωγής και της διαδικασίας εξουδετέρωσης από τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Αν συγκρίνει κανείς την αντιοξειδωτική διαδικασία εξουδετέρωσης σε κυτταρικό επίπεδο με αυτήν που επικρατεί στον εξωκυττάριο χώρο και στους αεραγωγούς, στους τελευταίους υπάρχει σημαντικά μειωμένη ικανότητα αντιοξειδωτικής εξουδετέρωσης των οξειδωτικών μορίων<sup>19</sup>. Αυτό σημαίνει ότι η φλεγμονή των αεραγωγών που παρατηρείται στις βρογχεκτασίες καθώς και σε άλλες πνευμονικές παθήσεις μπορεί να είναι πύο επιρροπής στο να παρουσιάζει υψηλή παραγωγή οξειδωτικών μορίων. Αυτό εξηγεί εν μέρει και την παρουσία υψηλών επιπέδων  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα. Ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων των βρόγχων, συμπεριλαμβανομένου των πολυμορφοκυττάρων, των ηωσινοφίλων και των μακροφάγων, οδηγεί σε μία εκσεσημασμένη παραγωγή οξειδωτικών μορίων συμπεριλαμβανομένου του  $H_2O_2$ <sup>20</sup>. Ειδικότερα θεωρείται ότι η μεγάλη παραγωγή  $H_2O_2$  προέρχεται από αύξηση του αριθμού των πολυμορφοκυττάρων<sup>21</sup>. Η ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων των βρόγχων και κυρίως των πολυμορφοκυττάρων αποτελεί σημαντικό τμήμα της φλεγμονώδους διαδικασίας σε ασθενείς με βρογχεκτασίες. Το βρογχοκυψεδικό έκπλυμα (BAL) ασθενών με βρογχεκτασίες περιέχει μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφοκυττάρων σε σύγκριση με αυτά που μετρήθηκαν σε φυσιολογικά άτομα<sup>4</sup>. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και στην δική μας μελέτη χρησιμοποιώντας όμως μία μη επεμβατική μέθοδο όπως είναι η προκλητή απόχρεμψη. Ο υψηλός αριθμός πολυμορφοκυττάρων, η σημαντική συσχέτισή τους με τα μετρηθέντα επίπεδα  $H_2O_2$  καθώς και η αρνητική συσχέτιση των μακροφάγων με τα επίπεδα  $H_2O_2$ , οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, στους ασθενείς με βρογχεκτασίες τα πολυμορφοκύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής  $H_2O_2$ . Με δεδομένο δε ότι, με την μέθοδο ανίχνευσης της αμυλάσης και με το σύστημα συλλογής συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα έχει αποκλειστεί η ανάμειξη του δείγματος με σίελο, που ως γνωστό, περιέχει υψηλά επίπεδα  $H_2O_2$ .

Στους ασθενείς με βρογχεκτασίες, κάποιοι δείκτες φλεγμονής σχετίζονται με την έκταση της νόσου ενώ άλλοι με τις λειτουργικές δοκιμασίες. Έχει βρεθεί ότι συστηματικοί δείκτες φλεγμονής που απομονώθηκαν από δείγματα ορού βρογχεκτασιακών ασθενών σχετίζονται άμεσα με την βαρύτητα της απόφραξης όπως

αυτή εκτιμάται με την σπιρομέτρηση<sup>5</sup>. Υπάρχει όμως η αμφισβήτηση κατά πόσον παράμετροι του ορού μπορεί να εκφράζουν την φλεγμονή που παρατηρείται στους αεραγωγούς ασθενών με βρογχεκτασίες. Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι τα επίπεδα του  $H_2O_2$  σχετίζονται με την  $FEV_1$  % αναμ. καθώς και με την έκταση της νόσου, όπως αυτή ορίστηκε με την HRCT. Ανάλογες συσχετίσεις παρατηρήθηκαν μεταξύ  $FEV_1$  % αναμ., HRCT και επί τοις εκατό αριθμού πολυμορφοκυττάρων στην προκλητή απόχρεμψη. Η συσχέτιση μεταξύ έκτασης της νόσου και απόφραξης των αεραγωγών είναι ήδη γνωστή<sup>22</sup>. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των πολυμορφοκυττάρων από το BAL σχετίζεται με το βαθμό απόφραξης των αεραγωγών όπως αυτή ορίστηκε με την  $FEV_1$  % αναμ.<sup>4</sup>. Αυτές οι προηγούμενες παρατηρήσεις οδηγούσαν στο συμπέρασμα ότι η βαρύτητα της λειτουργικής απόφραξης εκφράζει ως ένα βαθμό την βαρύτητα της φλεγμονής των αεραγωγών καθώς και την έκταση της νόσου. Η παραπάνω θεωρία επιβεβαιώθηκε εν μέρει και από την δική μας μελέτη η οποία επιπρόσθετα έδειξε ότι υφίσταται μία ακόμα σημαντική συσχέτιση, αυτή της έκτασης της νόσου με την πολυμορφοκυτταρική φλεγμονή από την προκλητή απόχρεμψη. Η τελευταία αυτή παρατήρηση είναι η πρώτη που θεωρεί ότι η βαρύτητα της φλεγμονής σε ασθενείς με βρογχεκτασίες σχετίζεται άμεσα με την έκταση της νόσου. Αν λοιπόν λάβουμε υπ' όψιν όλα τα παραπάνω, είναι προφανές ότι η φλεγμονή των αεραγωγών, η βαρύτητα της απόφραξης των αεραγωγών και η έκταση της νόσου αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την αξιολόγηση ασθενών με βρογχεκτασίες. Η πρώιμη δε αξιολόγηση τους μπορεί να αποτελέσει σημαντικό στοιχείο για την μετέπειτα πορεία της νόσου<sup>3,5</sup>. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θεωρούμε ότι η μέτρηση του  $H_2O_2$  μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βοήθημα στην αξιολόγηση και παρακολούθηση των παραμέτρων αυτών. Πρέπει να τονίσουμε όμως ότι οι λειτουργικές δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή δεν αποτελούν δείκτες της νόσου των μικρών αεραγωγών, ή της παρουσίας ή όχι ινώσεως. Η μελέτη αυτών των ειδικών λειτουργικών δοκιμασιών θεωρείται σημαντική στην αξιολόγηση της λειτουργι-

κής βαρύτητας της νόσου αλλά όχι στην παρακολούθησή της<sup>3</sup>.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς με άσθμα και σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας που ελάμβαναν στεροειδή, εισπνεόμενα ή παρεντερικά αντίστοιχα, είχαν χαμηλότερες τιμές  $H_2O_2$  στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, σε σχέση με αυτούς που δεν ελάμβαναν στεροειδή<sup>23,24</sup>. Το σημαντικό μειονέκτημα των μελετών αυτών είναι ότι δεν σχεδιάστηκαν ως διπλές τυφλές μελέτες και έτσι δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα για τον ρόλο των στεροειδών στις συγκεντρώσεις του  $H_2O_2$ . Σε μία πρόσφατη μελέτη με ανάλογο σχεδιασμό και σχετικά μικρό πληθυσμό μελέτης, η λήψη εισπνεόμενων στεροειδών συνδυάζετο με μειωμένη παρουσία T κυττάρων και IL-8 στο βρογχικό βλεννογόνο ασθενών με βρογχεκτασίες<sup>25</sup>. Σε ανάλογη μελέτη με σχεδιασμό διπλής-τυφλής, ασθενείς με βρογχεκτασίες που έλαβαν εισπνεόμενα στεροειδή παρουσίασαν μείωση του όγκου των πτυέλων και βελτίωση της σπιρομέτρησης<sup>26</sup>. Η δική μας μελέτη έδειξε ότι η λήψη στεροειδών δεν επηρέαζε θετικά καμμία παράμετρο από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για αξιολόγηση. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται ως προς το  $H_2O_2$  από προηγούμενες παρατηρήσεις όπου η χορήγηση μεθυλπρεδνιζολόνης δεν είχε καμμία επίδραση στην παραγωγή του<sup>27</sup>. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για το  $CO_6$  αλλά όχι για το  $NO^{17}$ , όπου ασθενείς που ελάμβαναν εισπνεόμενα στεροειδή είχαν χαμηλότερες τιμές εκπνεόμενου  $NO$  όταν συγκρίθηκαν με ασθενείς χωρίς λήψη εισπνεομένων στεροειδών. Η παραπάνω διαφορά μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το  $NO$  προέρχεται από κύτταρα πιο ευαίσθητα στα στεροειδή.

Συμπερασματικά, η μέτρηση του  $H_2O_2$ , σε συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα, αποτελεί μία απλή και κυρίως μία μη επεμβατική μέθοδο για την αξιολόγηση και ίσως για την παρακολούθηση ασθενών με βρογχεκτασίες. Παραμένει όμως ως μεγάλο ερωτηματικό αλλά και ως πρόκληση για μελλοντικές μελέτες κατά πόσον η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών, μέσω της μείωσης των οξειδωτικών μοριών, προκαλεί την ανάλογη κλινική και λειτουργική βελτίωση της νόσου.

## SUMMARY

**Relationship of exhaled hydrogen peroxide with cellular composition in induced sputum, functional status and extent of the disease in bronchiectasis****Loukides S., Bouros D., Papatheodorou G., Lachanis S., Panagou P., Kalogeropoulos N., Siafakas N.**

Oxidative stress contributes to airway inflammation and exhaled hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is elevated in patients with bronchiectasis. However, the precise role of  $H_2O_2$  in the pathophysiology of inflammatory processes remains unclear. We determined the concentration of exhaled  $H_2O_2$  in 30 patients with documented bronchiectasis (24 male, mean age  $39 \pm 2.5$  yrs,  $FEV_1$   $69 \pm 4$  % pred) and studied the relation between levels of exhaled  $H_2O_2$  and extent of the disease by high resolution computed tomographic scan (HRCT), spirometry and cellular population obtained from induced sputum. Additionally steroid treated patients were compared with steroid naive. Exhaled  $H_2O_2$  levels were significantly elevated in patients with bronchiectasis compared to 15 normal subjects (12 men, age  $34 \pm 4$  yrs,  $FEV_1$   $95 \pm 3$  % pred) ( $1.1 \pm 0.1$   $\mu M$  vs.  $0.3 \pm 0.04$   $\mu M$ ,  $p < 0.0001$ ). There was a significant positive correlation between  $H_2O_2$  percentage of neutrophils in induced sputum and extent of the disease, as defined by the HRCT scoring scale system ( $r=0.9$ ,  $p < 0.0001$  and  $r=0.66$   $p < 0.0001$ , respectively). A significant negative correlation was found between  $H_2O_2$  and  $FEV_1$  % pred ( $r=-0.42$ ,  $p < 0.05$ ). Patients who were on inhaled steroids had similar values with steroid naive ( $1.15 \pm 0.15$   $\mu M$  vs.  $1.02 \pm 0.1$   $\mu M$ ,  $p=0.12$ ). In conclusion, patients with bronchiectasis in stable condition showed increased levels of exhaled  $H_2O_2$ . Hydrogen peroxide levels could be an index of the inflammation, obstruction and extent of the disease. **Pneumon 2000, 13 (2): 144-153**

**Key words:** Bronchiectasis, oxidative inflammation, spirometry, computerized tomography, polymorphonuclear leucocytes

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Eller J, Lapa-e-Silva JR, Poulter LH, Lode H, Cole PJ. Cells and cytokines in chronic bronchial infection. Ann NY Acad Sci, 1994, 725: 331-345.
2. Barker AF, Bardana EJ. Bronchiectasis: Update of an orphan disease. Am Rev Respir Dis, 1988, 137: 969-978.
3. Hansell DM. Bronchiectasis. Rad Clinics North America, 1998, 36(1):107-128.
4. Sepper R, Kontinen YT, Ding Y, Takagi M, Sorsa T. Human neutrophil collagenase (MMP-8), identified in bronchiectasis BAL fluid, correlates with severity of disease. Chest, 1995, 107:1641-1647.
5. Wilson CB, Jones PW, O'Leary CJ, Hansell DM, Dowling RB, Cole PJ, Wilson R. Systemic markers of inflammation in stable bronchiectasis. Eur Respir J, 1998, 12: 820-824.
6. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, Kharitonov SA, Cole PJ, Barnes PJ. Increased levels of exhaled carbon monoxide in bronchiectasis. A new marker of oxidative stress. Thorax, 1998, 53: 867-870.
7. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Hargreave FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154: 308-317.
8. Pizzichini MMM, Pizzichini E, Clelland EL, Hargreave FE. Sputum in severe exacerbations of asthma: kinetics of inflammation indices after prednisone treatment. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155: 1501-1508.
9. Dohlman AW, Black HR, Royall JA. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in paediatric patients with asthma. Am Rev Respir Dis, 1993, 148: 955-960.
10. Baldiwn SR, Grum CM, Boxer LA, Simon RH, Ketai LH, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. Lancet, 1986, 1: 11-14.
11. Dekhuijzen RPN, Aben KKH, Dekker I, Aarts PHJ, Wielders PML, Van Herwaarden LA, Bast AALT. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with

- stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154: 813-816.
12. Loukides S., Horvath I, Wodehouse T, Cole PJ Barnes PJ. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158: 991-994.
  13. Gallati H, Pracht I. Horseradish peroxidase: kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1985, 23: 453-460.
  14. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell M, Barnes PJ. Effect of inhaled and oral glucocorticosteroids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155: 542-548.
  15. Keatings VM, O'Connor BJ, Wright LG, Huston DP, Corrigan CJ, Barnes PJ. Late response to allergen is associated with increased concentrations of TNF- $\alpha$  and interleukin-5 in induced sputum. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 99: 693-698.
  16. Jobsis Q, Raaatgeep HC, Schellekens SL, Hop WCJ, Hermans PWM, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J*, 1998, 12: 483-485.
  17. Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Kharitonov SA, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158: 1042-1046.
  18. Kharitonov SA, Wells AU, O'Connor BJ, Cole PJ, Hansell DM, Logan-Sinclair RB, Barnes PJ. Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 151: 1889-1893.
  19. Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of anti-oxidant defense. *Am Rev Respir Dis*, 1989, 143: 362-368.
  20. Greening AP, Lowrie DB. Extracellular release of hydrogen peroxide by human alveolar macrophages: the relationship to cigarette smoking and lower respiratory tract infection. *Clin Sci*, 1983, 65: 661-664.
  21. Hyslop PA, Sklar LA. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem*, 1984, 141: 280-286.
  22. Wong-You-Cheong JJ, Leahy BC, Taylor PM, Church CE. Airways obstruction and bronchiectasis: correlation with duration of symptoms and extent of bronchiectasis on computed tomography. *Clin Radiol*, 1992, 45: 256-259.
  23. Jobsis Q, Raatgeep HC, Hermans PWM, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur Respir J*, 1997, 10: 519-521.
  24. Sznajder JI, Fraiman A, Hall JB, Sanders W, Schmidt G, Crawford G, Nahum A, Factor P, Wood LDH. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest*, 1989, 96: 606-612.
  25. Gaga M, Bentley AM, Humbert M, Barkans J, O'Brien F, Wathen CG, Kay AB, Durham SR. Increases in CD4+ T lymphocytes, macrophages, neutrophils and interleukin 8 positive cells in the airways of patients with bronchiectasis. *Thorax*, 1998, 53: 685-691.
  26. Elborn JS, Johnston B, Allen F, Clarke J, McGarry J, Varghese G. Inhaled steroids in patients with bronchiectasis. *Respir Med*, 1992, 86:121-124.
  27. McLeish KR, Miller FN, Stelzer GT, Wellhausen SR. Mechanism by which methylprednisolone inhibits acute immune complex-induced changes in vascular permeability. *Inflammation*, 1986, 10: 321-332.

# Υποπληθυσμοί T λεμφοκυττάρων, μακροφάγα και η Αδενοσινοαπαμινάση: Η σχέση τους στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές

Μ. Γκάγκα  
Π. Μπακάκος  
Π. Λάτση  
Ι. Σαμαρά  
Δ. Ορφανίδου  
Α. Ρασιδάκης  
Π. Λάμπρου  
Ι. Δημητρούλης  
Ν. Κουλούρης  
Ι. Ιορδάνογλου

Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών,  
Βιοχημικό εργαστήριο, ΝΝΘΑ "Σωτηρία".

Λέξεις κλειδιά: T κύτταρα, ADA, μακροφάγα,  
φυματίωση, υπεζωκοτικές συλλογές

Αλληλογραφία:  
Γκάγκα Μίνα, Πνευμονολογική Κλινική Πανεπι-  
στημίου Αθηνών Νοσοκομείο "ΣΩΤΗΡΙΑ" Λεωφ.  
Μεσογείων 152, 115 27 ΑΘΗΝΑ Τηλ.: 7778827 -  
Fax: 7770423

Η εργασία παρελήφθη στις 19/1/2000 και εγκρί-  
θηκε προς δημοσίευση στις 18/5/2000.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Η Αδενοσινοαπαμινάση (ADA) αποτελεί ένα δείκτη ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση των φυματιωδών υπεζωκοτικών συλλογών. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η παραγωγή της σχετίζεται με τα T λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα τα οποία παρατηρούνται τόσο στις φυματιώδεις όσο και στις κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές, στις οποίες όμως η δραστηριότητα της ADA είναι χαμηλή. Επιπλέον τα δεδομένα που αφορούν τη συσχέτιση της ADA με τα T-κύτταρα στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές είναι αλληλοσυγκρουόμενα και βασίζονται σε μικρό αριθμό ασθενών. Σκοπός της μελέτης μας ήταν η εξέταση των κυτταρικών υποπληθυσμών στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές και η συσχέτιση τους με την ADA.

Εξετάστηκε το πλευριτικό υγρό 73 ασθενών από τους οποίους οι 37 είχαν φυματιώδη και οι 36 κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή. Η ανοσοκυτταροχημική μέθοδος APAAP χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση των T κυττάρων (CD3, CD4, CD8, CD25) και των μακροφάγων (CD68), ενώ η δραστηριότητα της ADA μετρήθηκε με την χρωματομετρική μέθοδο Guisti.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα κύτταρα CD3+, CD4+ και CD25+ και η δραστηριότητα της ADA ήταν σημαντικά υψηλότερα στις φυματιώδεις σε σχέση με τις κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές ( $p < 0.001$  για όλες τις μετρήσεις) ενώ τα CD68+ κύτταρα ήταν σημαντικά χαμηλότερα ( $p < 0.01$ ). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στους αριθμούς των CD8+ κυττάρων. Δεν βρέθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της ADA και των κυττάρων CD3 ( $r=0.18$ ), CD4 ( $r=0.05$ ), CD8 ( $r=0.09$ ), CD25 ( $r=0.06$ ), CD68 ( $r=0.04$ ).

Συμπεραίνουμε ότι οι φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές χαρακτηρίζονται από αυξημένη δραστηριότητα της ADA και αυξημένο αριθμό CD4+ T κυττάρων αλλά δεν υπάρχει συσχέτιση με-

**ταξύ της δραστηριότητας της ADA και του αριθμού κυττάρων.  
Πνεύμων 2000, 13 (2): 154-160**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η αδενοσινοαπαμινάση (ADA) είναι ένας δείκτης που χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση των φυματιωδών υπεζωκοτικών συλλογών και η αξία της έχει αναφερθεί σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών<sup>1-9</sup>. Το ένζυμο βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και η δραστηριότητά του είναι μεγαλύτερη στα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα<sup>10</sup>. Οι δύο αυτοί τύποι κυττάρων χαρακτηρίζουν τις φυματιώδεις αντιδράσεις και η παρουσία τους έχει φανεί στην πνευμονική φυματίωση<sup>11,12</sup>, τη δερματική αντίδραση φυματίνης<sup>13</sup> και στο πλευριτικό υγρό<sup>14-16</sup> μικρού αριθμού ασθενών. Παρόλα αυτά, παρόμοιοι αριθμοί κυττάρων έχουν αναφερθεί στις κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές, όπου ο τίτλος της ADA είναι χαμηλός<sup>3,14,15</sup>. Επιπλέον, ενώ ορισμένες μελέτες δείχνουν θετική συσχέτιση μεταξύ των κυττάρων και της ADA στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές, αυτό δεν έχει επιβεβαιωθεί από άλλες μελέτες<sup>17-19</sup>.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να εξετάσει την παρουσία των μακροφάγων και των υποπληθυσμών των T - κυττάρων στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές και την πιθανή τους συσχέτιση με την ADA. Τα ευρήματα συγκρίθηκαν με εκείνα των κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών.

**ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

**Ασθενείς**

Εξετάσθηκε το πλευριτικό υγρό από 73 ασθενείς. Τριάντα επτά ασθενείς είχαν φυματιώδη πλευριτίδα (20 άνδρες, μέση ηλικία 24), η διάγνωση της οποίας έγινε με βιοψία υπεζωκότα, είχαν θετική καλλιέργεια πλευριτικού υγρού ή PCR και 36 υπεζωκοτική συλλογή κακοήθους αιτιολογίας με θετική την κυτταρολογική εξέταση του πλευριτικού υγρού (28 άνδρες, μέση ηλικία 51), (18 αδενοκαρκινώματα, 10 πλακώδη, 7 μικροκυτταρικά, 1 μεσοθηλίωμα).

**Ανοσοκυτταροχημεία και μέτρηση της ADA**

Η αναρρόφηση του πλευριτικού υγρού έγινε πριν

από την έναρξη της θεραπείας. Ένα μικρό δείγμα χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του συνολικού αριθμού κυττάρων, του τύπου και της βιωσι-

μότητάς τους.

Χρησιμοποιήθηκαν 2 ml πλευριτικού υγρού για την ανοσοκυτταροχημεία τα οποία τοποθετήθηκαν ανά 150 μl σε ειδικά δοχεία και κυτταροφυγοκεντρήθηκαν επί 20min πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε κυτταροφυγόκεντρο cytospin 3 (Shandon, UK). Τα πλακίδια έμειναν για να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου επί μια ώρα, τυλίχθηκαν σε αλουμινοχαρτο κατά ζεύγη πλάτη με πλάτη και αποθηκεύθηκαν σε καταψύκτη στους -20° C, μέχρι να γίνει η ανοσοκυτταροχημική χρώση τους.

Πριν την ανοσοϊστοχημεία τα πλακίδια αφέθηκαν να ξεπαγώσουν μέσα στο περιτύλιγμά τους και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε ίσα μέρη ακετόνης - μεθανόλης επί 5min και τοποθετήθηκαν σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS). Η χρώση των μονοκλωνικών αντισωμάτων ανιχνεύθηκε με την τροποποιημένη μέθοδο της αλκαλικής φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης, όπως αυτή περιγράφηκε από τους Mason και Sammons<sup>20</sup>. Στο ρυθμιστικό διάλυμα προστέθηκε 20% φυσιολογικός ανθρώπινος ορός ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την πρόληψη της μη - ειδικής δέσμησης του δευτέρου και τρίτου στρώματος αντισωμάτων.

Συστηματικοί και ειδικοί μάρτυρες συμπεριλήφθησαν σε κάθε χρώση, χρησιμοποιώντας αμυγδαλές ανθρώπων που ελήφθησαν από εγχειρήσεις ρουτίνας αμυγδαλεκτομών καθώς και πρωτεΐνη μυελώματος ποινικού IgG2a ως αρνητικού μάρτυρα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αντι-CD3 (ολικά T - λεμφοκύτταρα), αντι-CD4 (T βοηθητικά κύτταρα), αντιCDB (T κατασταλτικά κύτταρα), αντι-CD25 (αντι-υποδοχέας ιντερλευκίνης-2) (Becton-Dickinson, Cowley, Oxford, UK) και αντιCD68 (μακροφάγα) (Dako Ltd., High Wycombe, UK). Το δείγμα του πλευριτικού υγρού που απέμεινε χρησιμοποιήθηκε για μέτρηση της ADA. Η δραστηριότητα της ADA μετρήθηκε με την χρωματομετρική μέθοδο Guisti<sup>21</sup>. Τα πλακίδια κωδικοποιήθηκαν και τα κύτταρα μετρήθηκαν με τυφλό τρόπο με την χρήση μικροσκοπίου BH2 (Olympus, Japan) και ειδική κλίμακα μέτρησης στον

προσοφθάλμιο σε μεγέθυνση 200. Τα θετικά και αρνητικά χρωματισθέντα κύτταρα μετρήθηκαν και ο αριθμός των κυττάρων που χρωματίστηκαν θετικά εκφράσθηκε ως ποσοστό. Τουλάχιστον δύο πλακίδια χρωματίστηκαν και μετρήθηκαν για κάθε αντίσωμα από κάθε ασθενή και υπολογίστηκε η μέση τιμή. Ο συντελεστής διακύμανσης για τρεις επαναλαμβανόμενες κυτταρικές μετρήσεις από τον ίδιο παρατηρητή για κάθε αντίσωμα ήταν -5% και η διακύμανση μεταξύ των παρατηρητών ήταν 9%.

### Ανάλυση των δεδομένων

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με την χρήση στατιστικού προγράμματος (Sigma Stat 2.0, Jandel Scientific, CA, USA). Η σύγκριση των αριθμών των κυττάρων μεταξύ των ομάδων έγινε με την δοκιμασία Mann-Whitney Rank Sum Test. Οι συσχετίσεις μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών και της ADA έγιναν με τη μέθοδο Spearman's Rank. Σημαντικές θεωρήθηκαν τιμές  $p \geq 0.005$ .

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη του κυτταρικού τύπου έδειξε υπεροχή των λεμφοκυττάρων και αυτό επιβεβαιώθηκε από την ανοσοκυτταροχημεία, όπου τα CD4+ T κύτταρα αναγνωρίστηκαν τόσο στις φυματιώδεις όσο και στις κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές. Τα ποσοστά όμως των CD3+ (διάμεσες τιμές, φυματίωση (TB): 78, καρκίνος (CA): 58,8), CD4+ (TB: 54,6, CA:42,2) και CD25 + (TB:2,1, CA: 0,6) ενεργοποιημένων T κυττάρων ήταν σημαντικά υψηλότερα στις φυματιώδεις σε σχέση με τις κακοήθεις συλλογές ( $p < 0.001$  για όλους τους κυτταρι-

κούς υποπληθυσμούς). Τα CD8 + κύτταρα ήταν λιγότερα και δεν σημειώθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων (TB: 9,2, CA: 12, 5, NS).

Τα ποσοστά των μακροφάγων ήταν επίσης χαμηλά τόσο στις φυματιώδεις όσο και στις κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές, αν και στις τελευταίες ήταν σημαντικά υψηλότερα (TB:4,2, CA: 7, B,  $p < 0.001$ ). Τα δεδομένα φαίνονται στον πίνακα 1.

Οι τιμές της ADA ήταν σημαντικά υψηλότερες στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές (TB:94, CA:28,  $p < 0.001$ ). Αν και οι τιμές της ADA ήταν υψηλότερες στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές, όπου τα CD3 +, CD4 + και CD25 + κύτταρα ήταν επίσης υψηλότερα, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ αυτών των κυττάρων και της δραστηριότητας της ADA. Ο συντελεστής συσχέτισης ήταν ως εξής: CD3  $r=0.18$ , CD4  $r=0.05$ , CD8  $r=0.09$ , CD25  $r=0.06$ , CD68  $r = 0.04$ .

Σε δύο μεγάλες μελέτες<sup>8,9</sup>, που αφορούσαν την ADA, χρησιμοποιήθηκαν ως ουδός οι τιμές 50 και 47 IU/L αντίστοιχα. Θεωρώντας είτε την τιμή 50 είτε την τιμή 47 IU/L ως ουδό, η ευαισθησία και η ειδικότητα της ADA ως διαγνωστικής εξέτασης ήταν υψηλή, 97,3 και 97,1% αντίστοιχα. Αντίθετα, θεωρώντας ως ουδό τα 25-75 εκατοστημόρια για κάθε κυτταρικό υποπληθυσμό, η ειδικότητα και η ευαισθησία παρέμειναν χαμηλές (πίνακας 2). Αυτό οφείλεται στην αλληλοεπικάλυψη των τιμών των κυττάρων στους ασθενείς με φυματίωση και κακοήθεια. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους πίνακες 1 και 2.

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τη μελέτη μας προκύπτει ότι, τόσο οι φυμα-

Πίνακας 1. Διάμεση τιμή (όρια αξιοπιστίας 25-75%) όλων των κυτταρικών τύπων και της ADA.

	Φυματίωση (TB)	Κακοήθεια (CA)	Μέση διαφορά (95% C.I)*	p
CD3	78 (68.5 - 85.9)	58.8 (49 - 68.5)	19 (13.7, 24.4)	< 0.001
CD4	54.6 (45 - 65.6)	42.3 (37.4 - 45.6)	13 (8.7, 17)	< 0.001
CD8	9.2 (7.2 - 11.3)	12.5 (8.2 - 16.5)	-1.82 (-4.3, 0.68)	NS
CD25	2.1 (1 - 3.7)	0.6 (0.3 - 1.5)	1.3 (0.2, 2.37)	< 0.001
CD68	4.2 (1.6 - 8.1)	7.8 (3.1 - 15.1)	-4.6 (-7.6, -1.5)	< 0.01
ADA	94 (69 - 111)	21 (19.8 - 33.3)	63.9 (50, 77)	< 0.001

\* όρια αξιοπιστίας



Πίνακας 2. Διαγνωστικοί Δείκτες: Εναισθησία και ειδικότητα (%) της ADA και των κυτταρικών τύπων.

	ADA	CD3	CD4	CD8	CD68	CD25
Εναισθησία	97.3	78	75.6	37.8	51.3	73.3
Ειδικότητα	97.1	76.4	77.1	74.2	75	85.7

τιώδεις όσο και οι κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές, χαρακτηρίζονται από λεμφοκυτταρικό τύπο με υψηλούς αριθμούς CD4+ T κυττάρων και συγκριτικά χαμηλούς αριθμούς κυττάρων CD8+. Οι φυματιώδεις όμως υπεζωκοτικές συλλογές έχουν σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ενεργοποιημένων CD3+ και CD4+ κυττάρων, όπως προέκυψε από την έκφραση του υποδοχέα IL-2 (CD25). Τα μακροφάγα αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του συνολικού αριθμού των κυττάρων και στους δύο τύπους των υπεζωκοτικών συλλογών, αν και είναι σημαντικά χαμηλότερο το ποσοστό τους στην φυματίωση. Η περισσότερη, αξιοσημείωτη διαφορά, μεταξύ φυματιώδων και κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών, αφορούσε τη δραστηριότητα της ADA η οποία ήταν σημαντικά υψηλότερη στην φυματίωση. Η τιμή της ADA ήταν υψηλή στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές όπου βρέθηκαν αυξημένοι και οι αριθμοί των CD3, CD4 και CD25 κυττάρων. Δεν διαπιστώθηκε όμως συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της ADA και των υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων ή των μακροφάγων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, όσον αφορά τον υψηλό αριθμό των T κυττάρων και τη δραστηριότητα της ADA στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές, συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων μελετών που βασίζονται όμως σε μικρότερο αριθμό ασθενών<sup>15,16,22</sup>. Τα αποτελέσματα σχετικά με την σχέση της ADA με τα T κύτταρα είναι αλληλοσυγκρουόμενες<sup>17,18</sup>. Στη μελέτη των Ocapa και συν<sup>17</sup>, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της ADA και την T κυττάρων ενώ οι Baganha και συν ανέφεραν καλή συσχέτιση<sup>18</sup>. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι στην τελευταία μελέτη, οι ασθενείς με φυματίωση και κακοήθεια θεωρήθηκαν ως μια ομάδα στην οποία βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο προαναφερθεισών παραμέτρων και εξετάστηκαν μόνο 11 ασθενείς με φυματίωση και 14 με κακοήθεια.

Εξετάσαμε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών στους οποίους όμως δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της ADA και του αριθμού των λεμφοκυτ-

τάρων ή μακροφάγων. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα της ADA στις φυματιώδεις, σε σχέση με τις κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές, μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές ιδιότητες των μακροφάγων ή των T λεμφοκυττάρων. Υπάρχουν αρκετές μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι τα T κύτταρα στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές ενεργοποιούνται περισσότερο από τα μακροφάγα που προέρχονται από τις ίδιες συλλογές και συγκεκριμένα, εκκρίνουν περισσότερες κυτταροκίνες από τα T κύτταρα του αίματος των ίδιων ασθενών ή από τα T κύτταρα υγιών εθελοντών<sup>23-24</sup>. Πιθανόν τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται καλύτερα από τα μακροφάγα τοπικά για μεγαλύτερη παραγωγή της ADA. Επιπλέον, σε μελέτη που αφορούσε την αντίδραση φυματίνης, οι Τσικόπουλος και συν<sup>25</sup> έδειξαν ότι, αντίθετα με την όψιμη δερματική αντίδραση που προκαλείται από αλλεργιογόνο, η επιβραδυνόμενη αντίδραση υπερευαισθησίας που προκαλεί η φυματίνη χαρακτηρίζεται από TH1 CD4+ κύτταρα τα οποία εκκρίνουν κυτταροκίνες όπως IFN-γ και TNF<sup>25</sup>. Σε προηγούμενη μελέτη μας βρήκαμε ότι η δραστηριότητα του TNF είναι μεγαλύτερη στις φυματιώδεις σε σχέση με τις κακοήθεις πλευριτίδες<sup>3</sup>. Από όσο γνωρίζουμε, οι φαινότυποι TH1, TH2, ή TH0 δεν έχουν ερευνηθεί εκτενώς στον καρκίνο. Οι διαφορές όσον αφορά την δραστηριότητα της ADA μεταξύ φυματιωδών και κακοήθων υπεζωκοτικών συλλογών μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικό TH φαινότυπο και αυτό ίσως φανεί από μελλοντικές μελέτες με χρήση υβριδισμού *in situ*.

Τελευταία έχει γίνει γνωστό ότι η δραστηριότητα της ADA προέρχεται από τη δράση δύο ισοενζύμων, της ADA1 που βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα, με ιδιαίτερα αυξημένη δραστηριότητα στα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα και της ADA2 η οποία βρίσκεται μόνο στα μονοκύτταρα και μακροφάγα<sup>10</sup>. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η δραστηριότητα της ADA στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές οφείλεται κυρίως στην δραστηριότητα του ισοενζύμου ADA2<sup>9,26,27</sup>. Συμφωνά με μια υπόθεση, η ADA2 απελευθερώνεται στα

βιολογικά υγρά (πλευριτικό υγρό, περιτοναικό, ENY, ορό) από τα μονοκύτταρα όταν αυτά φαγοκυτταρώσουν ένα μικροοργανισμό (βακτήριο, ιό ή πρωτόζωο)<sup>28,29</sup>. Στη μελέτη μας δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της ολικής δραστηριότητας της ADA και του αριθμού των μακροφάγων. Πιθανόν όμως η παραγωγή του ισοενζύμου ADA2 να σχετίζεται με ειδικούς υποπληθυσμούς μακροφάγων με διαφορετικές ιδιότητες και όχι με τους κυτταρικούς αριθμούς. Όσον αφορά τη βοήθεια που προσφέρει η δραστηριότητα της ADA στην διάκριση των φυματιωδών συλλογών, η μελέτη μας επιβεβαιώνει τα ευρήματα άλλων μελετών που έχουν δείξει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Αντίθετα, όσον αφορά τους κυτταρικούς υποπληθυσμούς, αν και υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων, οι διαφορές αυτές δεν είναι κλινικά ση-

μαντικές, καθώς οι τιμές αλληλοεπικαλύπτονται και τόσο η ευαισθησία όσο και η ειδικότητα είναι χαμηλές.

Συμπερασματικά, οι φυματιώδεις και οι κακοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές χαρακτηρίζονται από υψηλούς αριθμούς CD3+ και CD4+ κυττάρων, αν και στη φυματίωση οι αριθμοί είναι υψηλότεροι, υπάρχει ενεργοποίηση των T κυττάρων και υψηλή δραστηριότητα της ADA. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας του ενζύμου και του αριθμού των κυτταρικών υποπληθυσμών. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την διευκρίνιση της πηγής προέλευσης της ADA στις φυματιώδεις υπεζωκοτικές συλλογές. Η ADA αποτελεί ένα χρήσιμο δείκτη για την φυματίωση, ενώ το ίδιο δεν ισχύει για τους υποπληθυσμούς των T κυττάρων.

## SUMMARY

### *T lymphocyte subpopulations, macrophages and adenosine deaminase: Their relation in tuberculous pleural effusion*

**Gaga M., Bacacos P., Latsi P., Samara I., Orfanidou D., Rasidakis A., Lambrou P., Dimitroulis I., Koulouris N., Jordanoglou I.**

*Adenosine deaminase (ADA) is a widely used marker in the differential diagnosis of tuberculous effusion and there is evidence that its production is linked to T cells and monocytes. Both cell types are present in tuberculous effusions but are also present in malignant effusions where ADA activity is low. Furthermore, data on the correlation between ADA and T cells in tuberculous effusions are conflicting and based on small numbers of patients.*

*We undertook this study to examine cell subsets in tuberculous effusion and their correlation to ADA. Pleural fluid from 73 patients was examined (thirty-seven patients with tuberculous and thirty-six patients with malignant effusion). The APAAP immunocytochemical method was used to examine T cells (CD3, CD4, CD8, CD25) and macrophages (CD68) while ADA activity was measured by the Guisti colometric method.*

*Our results showed that CD3+, CD4+ and CD25+ cells and ADA were significantly higher in tuberculous effusion ( $p < 0.001$  for all measurements) while CD68+ were significantly lower ( $p < 0.001$ ). No differences were noted in CD68+ counts. No correlation was found between ADA and CD3 ( $r = 0.18$ ), CD4 ( $r = 0.05$ ), CD8 ( $r = 0.09$ ), CD25 ( $r = 0.06$ ), CD68 ( $r = 0.04$ ).*

*Tuberculous effusion is characterized by high ADA activity and increased numbers of CD4+ T cells, but no correlation exists between ADA activity and cell numbers. **Pneumon 2000, 13 (2): 154-160***

**Key words:** T cells, ADA, macrophages, TB, pleural effusion

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Burgess LJ, Maritz FJ, Le Roux I, Talzaard JJF. Combined use of pleural adenosine deaminase with lymphocyte/neutrophil ratio. *Chest* 1996, 109:414-419.
2. Ungerer J, Oosthuizen HM, Retiez JH, Bissbort SH. Significance of adenosine deaminase activity and its isoenzymes in tuberculous effusions. *Chest* 1994, 106:33-37.
3. Orphanidou D, Gaga M, Rasidakis A, Dimakou K, Toumbis M, Latsi P, Pandalos S, Christakopoulou J, Jordanoglou J. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion. *Respir Med* 1996, 90:95-98.
4. Aoki V, Katoh O, Nakanishi Y, Kuroki S and Yamada H. A comparison study of IFN- $\gamma$ , ADA and CA 125 as the diagnostic parameters in tuberculous pleuritis. *Respir Med* 1994, 88:139-143.
5. Piras MA, Gakis C, Burdroni M and Andreoni G. Adenosine Deaminase Activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. *Br Med J* 1978, 2:1751-1752.
6. Valdes L, San Jose E, Alvarez D, Saradeses A, Pose A, Chomon B. Diagnosis of tuberculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme and interferon gamma. *Chest* 1993, 103:458-465.
7. Ocana I, Martinez-Vasquez JM, Ribera E, Segura RM, Pascual C. Adenosine deaminase activity in the diagnosis of lymphocytic pleural effusion of tuberculosis, neoplastic and lymphomatous origin. *Tubercle* 1986, 67:141-145.
8. Burgess LJ, Martiz FJ, Roux I Le, Taljaard JJF. Use of adenosine deaminase as a diagnostic tool for tuberculous pleurisy. *Thorax* 1995, 50:672-674.
9. Valdes L, San Jose E, Alvarez D, Valle JM. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. *Eur Respir J* 1996, 9:747-751.
10. Ungerer JPJ, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Vermank WJH. Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clin Chem* 1992, 38:1322-1326.
11. Hoheisel GB, Tabak L, Teschler H, Erkan F, Kroegel C and Costabel U. Bronchoalveolar lavage cytology and immunocytology in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149:460-463.
12. Ozaki T, Nakahira S, Tani K, Ogushi F, Yasuoka S, Ogura T. Differential cell analysis in bronchoalveolar lavage. Fluid from pulmonary lesions of patients with tuberculosis. *Chest* 1992, 102:54-59.
13. Gaga M, Frew AJ, Varney VA and Kay AB. Eosinophil activation and T lymphocyte infiltration in allergen-induced late phase skin reactions and classical delayed type hypersensitivity. *J Immunol* 1991, 147:816-822.
14. Petterson T, Klockars M, Hellstrom PE, Riska H and Wangel T. T and B lymphocytes in pleural effusions. *Chest* 1978, 73:49-51.
15. Barnes P, Mistry SP, Cooper CL, Pirmez C, Rea TH and Modlin RL. Compartmentalization of a CD44 T lymphocyte subpopulations in tuberculous patients. *J Immunol* 1989, 142:1114-1119.
16. Moisan T, Chandrasekhar AJ, Robinson, McKenna J and Marti G. Distribution of lymphocytic subpopulations in patients with exudative pleural effusions. *Am Rev Respir Dis* 1978, 117:507-511.
17. Ocana I, Martinez Vasquez JM, Segura RM, Capdevilla JA. Adenosine deaminase in pleural fluids: Test for diagnosis of tuberculous pleural effusions. *Chest* 1983, 84:51-53.
18. Baganha MF, Pego A, Lima MA, Gaspar EV, Pharm B and Cordeiro AR. Serum and pleural adenosine deaminase: correlation with lymphocytic populations. *Chest* 1990, 97:605-610.
19. Bovornkitti S, Pushpakom R, Marahetra N, Nana A, Chroenratanakul S. Adenosine deaminase and lymphocytic populations. *Chest* 1991, 99:789-790.
20. Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol* 1978, 31:454.
21. Guisti G, Galanti B, Colorimetric method. In: Bergmeyer H ed *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed Weinheim: Verlag Chemic 1984, 315-323.
22. Ferrer J. Pleural tuberculosis. *Eur Respir J* 1997, 10:942-947.
23. Shimokata K, Saka H, Murate T, Hasegawa Y and Hasegawa I. Local cellular immunity in tuberculous pleurisy. *Am Rev Respir Dis* 1982, 126:822-824.
24. Kurasawa T, Shimokata K. Cooperation between accessory cells and T lymphocytes in patients with tuberculous pleurisy. *Chest* 1991, 100:1046-1052.
25. Tscopoulos A, Hamid Q, Varney V, Ying S, Moqbel R, Durham S, Kay AB. Differential messenger RNA expression of Th1-Type cells (IFN- $\gamma$ , IL-2) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J Immunol* 1992, 148:2058-2061.
26. Ungerer J, Oosthuizen HM, Retief JH and Bissbort SH. Significance of Adenosine Deaminase Activity and its Isoenzymes in Tuberculous Effusions. *Chest* 1994,

- 106:33-37.
27. Latsi P, Orphanidou D, Samara I, Rasidakis A, Provatia A, Tsourapis S, Retsou, Doris M, Sacharidou A, Jordanoglou J. Diagnostic value of Adenosine Diaminase (ADA) isoenzymes in tuberculous effusions. *Eur Respir J* 1999, 14 (30):1885.
  28. Gakis C, Calia G, Naitana A, et al: Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects: A hypothesis on the significance of ADA-2. *Panminerva Med* 1989, 31:107-113.
  29. Zuckerman SH, Olson JM, Douglas SD. Adenosine deaminase activity during in vitro culture of human peripheral blood monocytes and pulmonary alveolar macrophages. *Exp Cell Res* 1980, 129:281-287.

# Η επίπτωση της λοίμωξης από *Helicobacter Pylori* (*H. Pylori*) σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)

Λ. Τίνα  
Γ. Μπλαζογιαννάκης  
Ε. Αναστασάκου,  
Χ. Καποτής  
Ρ. Μαυρέα  
Σ. Τζάννες

7η Πνευμονολογική Κλινική ΝΝΘΑ

Λέξεις κλειδιά: *H. pylori*, ΧΑΠ, Κάπνισμα, Έλκος

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Σκοπός της εργασίας μας ήταν η σύγκριση της συχνότητας της λοίμωξης από *H. pylori* ανάμεσα σε ασθενείς με ΧΑΠ και σε υγιή πληθυσμό (καπνιστές / μη καπνιστές). Η παρουσία των αντισωμάτων IgG, IgA, IgM έναντι του μικροοργανισμού *H. pylori* μελετήθηκε σε δύο ομάδες πληθυσμού. Την πρώτη ομάδα αποτέλεσαν 39 ασθενείς με ΧΑΠ, μέσης ηλικίας 70 ετών, και τη δεύτερη 59 υγιείς, μέσης ηλικίας 53 ετών, εκ των οποίων οι 29 ήταν καπνιστές και οι 30 μη καπνιστές. Η αναγνώριση των αντισωμάτων *H. pylori* στον ορό έγινε με μέθοδο ELISA. Από τα αποτελέσματα δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά της επιπτώσεως της λοίμωξης από *H. pylori* παλαιάς ή πρόσφατης μεταξύ των ασθενών με ΧΑΠ και του υγιούς πληθυσμού. Επίσης δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην επίπτωση της λοίμωξης, παλαιάς ή πρόσφατης, μεταξύ των ομάδων του υγιούς πληθυσμού, καπνιστών και μη καπνιστών. Εάν και το κάπνισμα αποτελεί γνωστό προδιαθεσικό παράγοντα για την ανάπτυξη έλκους, δεν υπάρχουν ενδείξεις πως αυτό σχετίζεται και με αυξημένη επίπτωση της λοίμωξης από *H. pylori*. *Πνεύμων 2000, 13 (2): 161-165*

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης μας αποτέλεσε η σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης της λοίμωξης από *H. Pylori* ανάμεσα σε ασθενείς με ΧΑΠ και σε υγιή πληθυσμό (καπνιστές και μη καπνιστές).

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*H. pylori*) είναι ένα κοινό μικρόβιο του ανθρώπινου οργανισμού. Υπολογίζεται ότι το ήμισυ του πληθυσμού της γης έχει μολυνθεί από αυτό<sup>1</sup>. Ενώ η αιτιολογική του συσχέτιση

Η εργασία παρελήφθη στις 10/1/2000 και εγκρίθηκε προς δημοσίευση στις 18/5/2000.

με την πλειονότητα των πεπτικών ελκών είναι αναμφισβήτητη, η προταθείσα σχέση του με άλλες παθήσεις όπως ο καρκίνος του στομάχου, η μη ελκωτική δυσπεψία, η ελκοπάθεια από τη λήψη μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAID) αλλά και άλλων παθήσεων είναι μόνο ενδεικτική και χρειάζεται περαιτέρω μελέτη και εκτίμηση<sup>1</sup>.

Αξιοσημείωτη όμως είναι και η συσχέτισή του με άλλους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη πεπτικού έλκους, όπως το κάπνισμα. Το κάπνισμα σχετίζεται με αυξημένη επίπτωση γαστρικού και κυρίως δωδεκαδακτυλικού έλκους, είτε υποβοηθώντας επιθετικούς παράγοντες του βλεννογόνου, είτε παρεμποδίζοντας προστατευτικούς για το βλεννογόνο μηχανισμούς<sup>2-6</sup>.

Σε μια μελέτη, το ποσοστό αναμενόμενου κινδύνου στον γενικό πληθυσμό για την ανάπτυξη του πεπτικού έλκους είναι 31% σε λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο, μόνο, και 34% σε συνύπαρξη καπνιστικής συνήθειας και λοίμωξης από *H. pylori*<sup>7</sup>. Αμφιλεγόμενο όμως παραμένει εάν το κάπνισμα προδιαθέτει σε λοίμωξη από *H. pylori* και εάν υποβοηθά τις συνέπειές της<sup>7-9</sup>. Επίσης εάν και είναι γνωστό ότι η επίπτωση του δωδεκαδακτυλικού έλκους είναι αυξημένη σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ)<sup>3</sup>, δεν έχει μελετηθεί η συσχέτισή της με την επίπτωση της *H. pylori* λοίμωξης σε αυτούς τους ασθενείς.

## ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικό αποτέλεσαν 39 Έλληνες ασθενείς με ΧΑΠ μέσης ηλικίας 71,15±9,05, 14 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας (ΜΟΗ) 67,28 έτη ± 7,58 και 25 άνδρες ΜΟΗ 73,83 ± 9,26 έτη. Όλοι οι ασθενείς είχαν γνωστό ιστορικό ΧΑΠ (βήχας με απόχρεμψη 3 μήνες το χρόνο για τουλάχιστον δύο συνεχή έτη, νοσηλείες λόγω επιδείνωσης της νόσου τους στο παρελθόν). Από αυτούς οι 20 ελάμβαναν οξυγονοθεραπεία κατ' οίκον. Οι ασθενείς στο σύνολό τους ελάμβαναν εισπνεόμενους β2 διεγέρτες και δισκία θεοφυλλίνης per os, με περιστασιακή λήψη αντιβιοτικής αγωγής σε παρόξυνση της νόσου λόγω λοίμωξης. Μόνο 4 από τους ασθενείς ελάμβαναν συστηματικά μεθυλπρεδνιζολόνη per os, προ της νοσηλείας τους.

Από το σύνολο των ασθενών, 8 έπασχαν από σακ-

χαρώδη διαβήτη (ΣΔ) τύπου 2 και ελάμβαναν αντιδιαβητικά δισκία, 6 έπασχαν από αρτηριακή υπέρταση και ελάμβαναν αγωγή και 4 από τους πάσχοντες με ΣΔ έπασχαν και από αρτηριακή υπέρταση και ευρίσκοντο υπό αντιυπερτασική αγωγή. Κανένας από τους ασθενείς δεν ανέφερε συστηματική λήψη μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων.

Ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 59 Έλληνες υγιείς μέσης ηλικίας 52,81±15,96, εκ των οποίων οι 29 ήταν καπνιστές με >10 τσιγάρα ημερησίως, (9 γυναίκες ΜΟΗ 42,66 ± 9,51 και 20 άνδρες ΜΟΗ 47,5±14,74) και 30 μη καπνιστές (23 γυναίκες ΜΟΗ 64,04±13,8 και 7 άνδρες ΜΟΗ 44,14±11,29). Τα άτομα της ομάδας ελέγχου δεν ανέφεραν ιστορικό αναπνευστικού ή άλλου νοσήματος και δεν ελάμβαναν κάποια αγωγή. Η επιβεβαίωση της λοίμωξης από *H. pylori* έγινε με την ανίχνευση στον ορό των εξεταζομένων αντισωμάτων IgM, IgA (πρόσφατη λοίμωξη) και IgG (παλαιά λοίμωξη) με μέθοδο Elisa, η δε στατιστική ανάλυση με τη μέθοδο χ<sup>2</sup>-διόρθωση κατά Yates. Η διαφορά ηλικίας των ασθενών με ΧΑΠ και της ομάδας ελέγχου ελέγχθηκε με student t-test και βρέθηκε στατιστικά λίαν σημαντική (p<0,001).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τους ασθενείς με ΧΑΠ, 61,5% βρέθηκαν να είναι οροθετικοί στην *H. pylori* ανοσοσφαιρίνη Ig G (παλαιά λοίμωξη). Το 56,4% των ασθενών με ΧΑΠ ήταν οροθετικοί στις ανοσοσφαιρίνες Ig A και Ig M (πρόσφατη λοίμωξη). Στην ίδια εξεταζόμενη κατηγορία (ΧΑΠ) από τους ασθενείς με ΣΔ (n=8) οι 6 ήταν οροθετικοί στην ανοσοσφαιρίνη IgG και οι 2 ήταν οροθετικοί στις IgA, IgM.

Από τους ασθενείς με ΣΔ και αρτηριακή υπέρταση (n=4), οι 3 ήταν οροθετικοί στην IgG και μόνο 1 στην IgA. Από τους ασθενείς πάσχοντες από αρτηριακή υπέρταση (n=6), οι 5 ήταν οροθετικοί στην ανοσοσφαιρίνη IgG. Τέλος, από τους ασθενείς με ΧΑΠ μόνον 5 ανέφεραν ιστορικό δωδεκαδακτυλικού έλκους για το οποίο έλαβαν φαρμακευτική αγωγή στο παρελθόν με ομεπραζόλη, και παρά το γεγονός ότι ανέφεραν επιγαστραλγία και αίσθημα καύσου, μόνο 2 από αυτούς ήταν οροθετικοί στην ανοσοσφαιρίνη IgG.

Από τον υγιή πληθυσμό, 71,1% ήταν οροθετικοί

στην ανοσοσφαιρίνη IgG και 69,4% οροθετικοί για τις IgA και IgM.

Η διαφορά της εμφάνισης της λοίμωξης *H. pylori* μεταξύ υγιών και ασθενών με ΧΑΠ, πρόσφατης και παλαιάς δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Στην ομάδα του υγιούς πληθυσμού η αντίχνευση των παραπάνω αντισωμάτων ήταν ως εξής:

Καπνιστές: 62% οροθετικοί στην ανοσοσφαιρίνη IgG και 65.5% οροθετικοί στις IgA και IgM.

Μη καπνιστές: 80% οροθετικοί στην ανοσοσφαιρίνη IgG και 73,3% στις IgA και IgM.

Η διαφορά στην επίπτωση της λοίμωξης *H. pylori*, πρόσφατης ή παλαιάς, μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών, δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική. (Πίνακες 1, 2, 3 και 4).

Πίνακας 1. Η οροθετικότητα στις IgA και IgM στους ασθενείς με ΧΑΠ και στον υγιή πληθυσμό

	IgM Υγιείς	IgA ΧΑΠ	Σύνολο
Θετικοί	41	22	63
Αρνητικοί	18	17	35
Σύνολο	59	39	98

Πίνακας 2. Η οροθετικότητα στην IgG στους ασθενείς με ΧΑΠ και στους υγιείς

	IgG Υγιείς	ΧΑΠ	Σύνολο
Θετικοί	42	24	66
Αρνητικοί	17	15	32
Σύνολο	59	39	98

Πίνακας 3. Η οροθετικότητα στις IgM, IgA στους καπνιστές και τους μη καπνιστές στο σύνολο των υγιών

	IgM Μη καπν.	IgA Καπν.	Σύνολο
Θετικοί	22	19	41
Αρνητικοί	8	10	18
Σύνολο	30	29	59

Πίνακας 4. Η οροθετικότητα στην IgG σε καπνιστές και μη καπνιστές στο σύνολο των υγιών

	IgG Μη Καπν.	Καπν.	Σύνολο
Θετικοί	24	18	42
Αρνητικοί	6	11	17
Σύνολο	30	29	59

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παθογένεση του πεπτικού έλκους είναι πολυπαράγοντική με το γαστρικό οξύ και την πεψίνη να παίζουν το μεγαλύτερο ρόλο. Τόσο το δωδεκαδακτυλικό όσο και το γαστρικό έλκος αποτελούν καταστάσεις συχνά προκαλούμενες από τον μικροοργανισμό *H. pylori*<sup>2,3</sup>.

Η λοίμωξη από *H. pylori* εμφανίζεται σε όλον τον κόσμο και όπως φαίνεται σχετίζεται με την ηλικία. Στις ανεπτυγμένες χώρες, η επίπτωση της αυξάνει παράλληλα με την ηλικία, προσβάλλοντας σχεδόν το ήμισυ του πληθυσμού στην ηλικία των πενήντα ετών<sup>10</sup>. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η λοίμωξη είναι πολύ διαδεδομένη στους ενήλικες και αποκτάται στην παιδική ηλικία. Τα παιδιά είναι δυνατόν να μολυνθούν και κατά τον πρώτο χρόνο της ζωής τους, γεγονός που αναδεικνύει τους κοινωνικούς-οικονομικούς παράγοντες ως σημαντική επιδημιολογική παράμετρο<sup>10</sup>. Στη μελέτη μας, παρά τη στατιστικά σημαντική διαφορά της ηλικίας της ομάδος των ασθενών και της ομάδος ελέγχου ( $p < 0,001$ ), οι μέσοι όροι ηλικίας και στις δύο ομάδες ήταν  $> 50$  ετών, ηλικία στην οποία φαίνεται η λοίμωξη να παρουσιάζει στασιμότητα, λόγω ανάπτυξης γαστρικής ατροφίας και εντερικής μεταπλασίας του φλεγμαίνοντος γαστρικού βλεννογόνου<sup>10</sup>, και άρα θεωρούμε ότι δεν επηρεάζονται τα τελικά αποτελέσματα και συμπεράσματά μας.

Στο *H. pylori* έχει αποδοθεί παγκοσμίως η χρόνια ενεργός γαστρίτιδα και ο αυξημένος κίνδυνος για Δ.Ε. και Γ.Ε.: Το 95-100% των ασθενών με Δ.Ε. και το 75-85% των ασθενών εμφανίζουν λοίμωξη από *H. pylori*. Το υπόλοιπο ποσοστό των πεπτικών ελκών σχετίζεται με άλλους παράγοντες, όπως μακροχρόνια λήψη N.S.A.I.D. ή ασπιρίνης, το stress και το σύνδρομο Zollinger - Ellison<sup>3,7,10</sup>.

Το *H. pylori* παράγει μια σειρά πρωτεϊνών που φαίνεται να διευκολύνουν τις βλαπτικές επιπτώσεις του στο γαστρικό βλεννογόνο. Η ουρεάση που παράγει, βοηθά τον αποικισμό του στομάχου από το *H. pylori* και το προστατεύει από τη δράση του γαστρικού οξέος. Τα  $H^+$  τα οποία γεννώνται από το ισοζύγιο νερού και αμμωνίας ευοδώνουν τη βλάβη του γαστρικού επιθηλίου. Επίσης παράγει πρωτεΐνες με χημειοτακτικό ρόλο, με την έκκριση PAF εντείνει τη φλεγμονή ενώ με την παραγωγή πρωτεασών και φωσφολιπασών μειώνει το πάχος και τη ρευστότητα της βλέννης<sup>10</sup>.

Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η αποκλεισμένη πρωτεΐνη Gag-A, η οποία ανευρίσκεται σε ορισμένα στελέχη του μικροβίου και που έχει σχετισθεί με τον γαστρικό καρκίνο. Η σημασία της συσχέτισης *H. pylori* και πεπτικού έλκους, φαίνεται να επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι, μετά τη θεραπευτική αγωγή για εκκρίζωση του μικροοργανισμού, μειώνεται, από 80% σε περίπου 15-20%, το ποσοστό των ασθενών με Δ.Ε., που υποτροπιάζε κατά το πρώτο έτος<sup>3,10</sup>.

Ο ρόλος του καπνίσματος στη δημιουργία πεπτικού έλκους είναι σημαντικός. Οι καπνιστές έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν έλκος, τα έλκη στους καπνιστές θεραπεύονται δυσκολότερα και η υποτροπή έλκους είναι πιθανότερη σε καπνιστές<sup>2</sup>.

Το κάπνισμα διεγείρει την έκκριση πεψίνης, επιταχύνει την παροχέτευση του γαστρικού οξέος στο δωδεκαδάκτυλο και προωθεί την παλινδρόμηση του περιεχομένου του δωδεκαδακτύλου στο στομάχι, αυξάνει την παραγωγή ελεύθερων ριζών, βασοπρεσίνης, ενδοθηλίνης από το γαστρικό βλεννογόνο και PAF

(Platelet Activating Factor). Επιπλέον, επιδρά στους προστατευτικούς μηχανισμούς του γαστρικού βλεννογόνου μειώνοντας την αιμάτωσή του αναστέλλει και την έκκριση γαστρικής βλέννης και προσταγλαδινών, καθώς και την παραγωγή διπτανθρακικών από το πάγκρεας και το δωδεκαδάκτυλο<sup>2</sup>.

Το κάπνισμα επίσης φαίνεται να μειώνει τα θεραπευτικά αποτελέσματα των  $H_2$ -ανταγωνιστών, αλλά δεν επηρεάζει τη θεραπευτική αγωγή για την εκκρίζωση του *H. pylori*<sup>11,12</sup>.

Κάποιοι έχουν συσχετίσει το κάπνισμα με αυξημένο κίνδυνο για λοίμωξη από *H. pylori*, ενώ άλλες μελέτες δείχνουν πως το κάπνισμα δεν αυξάνει την υποτροπή των ελκών μετά την εκκρίζωση του *H. pylori*<sup>2,11,12</sup>.

Σε πρόσφατη μελέτη<sup>13</sup>, αυξημένη επίπτωση της λοίμωξης από *H. pylori* σχετίστηκε με καπνιστική συνήθεια, υψηλή αρτηριακή πίεση, υψηλές τιμές σακχάρου, χαμηλότερη της προβλεπόμενης FEV<sub>1</sub> (δυναμικά εκπνεόμενος όγκος αέρα στο πρώτο δευτερόλεπτο) και χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο.

Παρόλο που η Χ.Α.Π. είναι πάθηση των ενηλίκων συνήθως μετά την 4η δεκαετία και συνδυάζεται απολύτως με το κάπνισμα<sup>14</sup>, εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου<sup>15</sup> και παρουσιάζει αυξημένη επίπτωση δωδεκαδακτυλικού έλκους<sup>3</sup>, δεν φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένη επίπτωση λοίμωξης από *H. pylori*. Το κάπνισμα εάν και έχει, σύμφωνα με τα παραπάνω, σαφώς σχετισθεί με τη δημιουργία έλκους και γαστρίτιδος, δεν φαίνεται εδώ να σχετίζεται με αυξημένη επίπτωση λοίμωξης από *H. pylori*.

## SUMMARY

### *The incidence of Helicobacter pylori (H. pylori) infection in COPD patients*

**L. Tina, G. Blazogiannakis, E. Anastasakou, Ch. Kapotis, R. Maurea, S. Tzannes**

*The aim of the present study was the detection of H. pylori IgG, IgM, IgA antibodies in the serum of two groups of individuals. The first group consisted of 39 COPD patients and the second group consisted of 59 healthy individuals, 29 of whom were smokers and 30 non-smokers. The detection of H. pylori antibodies in the serum was performed using ELISA. The results did not confirm that there is a statistical difference in the incidence of H. pylori infection between the two groups. There is also no significant difference in the incidence of H. pylori infection (old or recent) between the subgroups of healthy individuals (smokers/non-smokers). Although smoking is a known contributor to the patho-*



*genesis of peptic ulcer disease, it does not influence the incidence of H. pylori infection. Pneumon 2000, 13 (2): 161-165*

**Key words:** *H. pylori, COPD, smoking, peptic ulcer*

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ηλίας Γ Μαλλάς. Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού - ένα διάσημο μικρόβιο. Ενημέρωση, 1999, 22.
2. Eastwood GL. Is smoking still important in the pathogenesis of peptic ulcer disease? J Clin Gastroenterol 1997, 25 Suppl 1:S1-7.
3. Harrison. Principles of Internal medicine. Peptic ulcer and related disorders. Lawrens S. Friedman, Walter L. Peterson.
4. Leoci C, Ierardi E, Chiloiro M, Piccioli E, Di Matteo G, Misciagna G, Giorgio I. Incidence and risk factors of duodenal ulcer. A retrospective cohort study. J Clin Gastroenterol 1995, 20(2):104-9.
5. Iwata F, Leung FW. Tobacco cigarette smoke aggravates gastric ulcer in rats by attenuation of ulcer margin hyperemia. Am J Physiol 1995, 268 (1 Pt 1):G153-60.
6. Iwata F, Zhang XY, Leung FW. Aggravation of gastric mucosal lesions in rat stomach by tobacco cigarette smoke. Dig Dis Sci 1995, 40(5):1118-24.
7. Kurata JH, Nogawa AN. Meta-analysis of risk factors for peptic ulcer. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, H. pylori and smoking. J Clin Gastroenterol 1997, 24 (1):2-17.
8. Shinchi K, Ishii H, Imanishi K, Kono S. Relationship of cigarette smoking, alcohol use, and dietary habits with H. pylori infection in Japanese men. Scand J Gastroenterol 1997, 32(7):651-5.
9. Mart' in-de-Argila C, Boixeda D, Cant on R, Mir N, de Rafael L, Gisbert J, Arocena C, Carc'ia Plaza A. Helicobacter pylori infection in a healthy population in Spain. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996, 8(12):1165-8.
10. Richart V. Heatley. Οδηγός για το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού.
11. Kadayif Eci A, Simsek H. Does smoking influence the eradication of Helicobacter pylori and duodenal ulcer healing with different regimens? Int J Clin Pract 1997, 51(8):516-71.
12. Chan FK, Sung JJ, Lee WK, Chan LY, Yung MY, Chung SC. Does smoking predispose to peptic ulcer relapse after eradication of Helicobacter pylori? Am Gastroenterol 1997, 92(3):442-5.
13. Whincup PH, Mendall MA et al: Prospective relations between Helicobacter pylori infection, coronary heart disease, and stroke in middle aged men. Heart 1996, 75(6): 568-72.
14. Ν. Γεωργιάτου-Παπαγεωργίου, Μ. Τουμπής. Επιδημιολογία-Παθοφυσιολογία του άσθματος και της χρόνιας βρογχίτιδος. Προβληματισμοί για το άσθμα και τη χρόνια βρογχίτιδα. Σελ. 9-69, 1999.
15. Δ. Ορφανίδου - Μ. Ντάγανου. Κλινική εικόνα άσθματος και χρόνιας βρογχίτιδος. Προβληματισμοί για το άσθμα και τη χρόνια βρογχίτιδα. Σελ. 104-133, 1999.