

## KLINIKINIAI TYRIMAI

### Indukuotų skreplių ląstelinės sudėties savybės sergant alergine ir nealergine astma

Algirda Krišukėnienė<sup>1</sup>, Brigita Šitkauskienė<sup>1, 2</sup>, Kęstutis Malakauskas<sup>1</sup>, Raimundas Sakalauskas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kauno medicinos universiteto Biomedicininių tyrimų instituto Pulmonologijos laboratorija

<sup>2</sup>Kauno medicinos universiteto Pulmonologijos ir imunologijos klinika

**Raktažodžiai:** alerginė astma, nealerginė astma, indukuoti skrepliai, imuninės ląstelės.

**Santrauka.** Astma pasireiškia lėtiniu kvėpavimo takų uždegimu, kuriame dalyvauja įvairios imunokompetentinės ląstelės, jų išskiriami mediatoriai ir adhezijos molekulės (Global Initiative for Asthma (GINA), 2004). Klinikinėje praktikoje astma skirstoma į alerginę ir nealerginę, tačiau imunopatologinės šių dviejų formų savybės iki šiol nėra išsamiai ištirtos.

Tyrimo tikslas. Įvertinti indukuotų skreplių ląstelių sudėties savybes sergant alergine ir nealergine astma.

Metodai. Ištyrėme 41 pacientą (amžiaus vidurkis  $51,8 \pm 1,5$  metų), sergantį lengva persistuojančia astma, negydyta inhaliuojamaisiais ar sisteminio poveikio gliukokortikosteroidais. Remiantis alergologinės anamnezės alerginių odos dūrio mėginių tyrimo duomenimis, šie pacientai suskirstyti į dvi grupes: sergantys alergine astma ( $n=21$ ) ir nealergine astma ( $n=20$ ). Visiems tiriamiesiems atliktas spirometrinis tyrimas, bronchų provokacinis inhaliacinis mėginys su metacholinu, provokuojamajai metacholino dozei nustatyti ( $PD_{20}$ ), ir skreplių indukcija naudojant hipertonišią natrio chlorido tirpalą. Indukuotų skreplių ląstelių sudėtis vertinta naudojant May-Grünwald-Giemsa dažymo metodą.

Rezultatai. Pacientų, sergančių nealergine astma, skrepliuose rastas žymiai didesnis ląstelių kiekis ( $1,97 \pm 0,33$  vs  $1,23 \pm 0,11 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p < 0,01$ ); neutrofilų ( $1,34 \pm 0,18$  vs  $0,41 \pm 0,06 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p < 0,01$ ); limfocitų ( $0,36 \pm 0,04$  vs  $0,15 \pm 0,03 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p < 0,01$ ) lyginant su sergančiųjų alergine astma analogiškais duomenimis. Eozinofilų ir makrofagų kiekis skrepliuose tarp abiejų grupių tiriamųjų reikšmingai nesiskyrė. Pacientų, sergančių nealergine astma, grupėje nustatyta sąsaja tarp limfocitų kiekio skrepliuose ir  $PD_{20}$  ( $R_s = 0,41$ ,  $p < 0,05$ ). Alerginė astma sergančiųjų grupėje nustatyta sąsaja tarp eozinofilų kiekio skrepliuose ir  $PD_{20}$  ( $R_s = 0,71$ ,  $p < 0,05$ ).

Išvados. Remiantis duomenimis, galima daryti prielaidą, kad nealerginės astmos patogenezėi gali būti reikšmingesni limfocitai, o alerginės astmos patogenezėi – eozinofilai.

#### Įvadas

Astma – tai lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga, kliniškai pasireiškianti bronchų obstrukcija (kuri išnyksta savaime) ir bronchų hiperreaktyvumu (1). Tačiau iki šiol neiširta, kas lemia padidėjusį bronchų reaktyvumą. Manoma, kad svarbus vaidmuo tenka persistuojančiam lėtiniam kvėpavimo takų uždegimui (2, 3). Būdingiausi patomorfologiniai požymiai, rodantys lėtinį persistuojantį uždegimą ir jo padarinius sergant astma, yra audinių infiltracija leukocitais, epitelio pažeidimas, bazinės membranos sustorėjimas, gleivės sekretuojančių ląstelių hiperplazija ir edema, bronchų lygiųjų raumenų hipertrofija (4). Klinikinėje

praktikoje astma vertinama kaip įvairialypė varijuojančios klinikinės eigos liga, pasireiškianti skirtingu atsaku į gydymą. Jau 1947 metais F. M. Rackemann su bendraautoriais astmą suskirstė į išorinę, pasireiškiančią jaunesnio amžiaus žmonėms (iki 30 metų), ir vidinę, kliniškai pasireiškiančią vyresnio amžiaus žmonėms (vyresniems nei 40 metų) (5). Nuo 2001 metų astma klasifikuojama į alerginę ir nealerginę (6). Visuotinės astmos iniciatyvos (GINA) rekomendacijose alerginė ir nealerginė astma apibūdinamos kaip kliniškai skirtingos, bet patomorfologiškai panašios ligos formos (1), tačiau per pastaruosius du dešimtmečius pateikiama vis daugiau klinikinių ir eksperi-

mentinių tyrimų duomenų, rodančių šių ligos formų patomorfologinius ir patofiziologinius skirtumus. Tiriant alergine astma sergančius pacientus, įrodytas eozinofilų ir II tipo T limfocitų pagalbininkų (helperių) vaidmuo lėtinio ligos uždegimo metu bei šių ląstelių sąsaja su padidėjusiu bronchų reaktyvumu (2, 7). Deja, duomenų apie nealerginės astmos patomorfologinius ir patofiziologinius pokyčius iki šiol nedaug ir jie prieštaringi (8). P. Gibson su bendraautoriais teigia, kad sergant nealergine astma, viena svarbesnių ląstelių, dalyvaujančių lėtiniame uždegime, yra eozinofilas (9), kiti tyrėjai nurodo esant svarbų putliųjų ląstelių vaidmenį (10). Tiriant uždegiminio proceso aktyvumą, rodantį azoto monoksido (NO) kiekį iškvėpiamame ore, nustatyta, kad alergine astma sergančių pacientų iškvėpiamame ore NO yra daugiau negu sergančiųjų nealergine astma (11), be to, jų kvėpavimo takai jautresni įkvėpiamam adeno-5-monofosfatui negu sergančiųjų nealergine astma (12). Vertinant indukuotų skreplių ląstelių sudėtį, nustatyta, kad, sergant lengva astma, vyraujanti ląstelė yra eozinofilas, o sergant sunkia ir gydymui atsparia ligos forma skrepliuose randama daugiau neutrofilų (13, 14). Deja, iki šiol neaiški astmos uždegimo procese dalyvaujančių ląstelių reikšmė padidėjusiam bronchų reaktyvumui. E. Pizzini su bendraautoriais nustatė reikšmingų sąsajų sąryšį tarp eozinofilų kiekio skrepliuose ir bronchų hiperreaktyvumo (13), o kiti autoriai nurodė silpną (15) ar nereikšmingą sąsają tarp šių ląstelių ir bronchų hiperreaktyvumo (16). Tai patvirtina hipotezę, kad astma yra heterogeninė liga.

Šio tyrimo tikslas – nustatyti indukuotų skreplių ląstelių sudėtį pacientams, sergantiems alergine ir nealergine astma, bei galimą sąsają su bronchų reaktivitymo pokyčiais sergant šiomis ligomis.

#### Tirtųjų kontingentas ir tyrimo metodai

Iš Kauno medicinos universiteto klinikose ambulatoriškai konsultuotų pacientų pagal astmos tyrimo protokolą, patvirtintą Kauno regioniniame biomedicininio tyrimų etikos komitete, tyrimui atrinktas 41 pacientas, sergantis lengva persistuojančia astma. Tiriamiesiems astma diagnozuota remiantis tarptautiniais GINA kriterijais (1).

Tiriamųjų atrankos kriterijai:

- Astmos simptomai vargina ne mažiau kaip 12 mėnesių, bet ne ilgiau kaip ketverius metus.
- Pacientai, kurie negydyti įkvėpiamaisiais ar geriamaisiais gliukokortikosteroidais.
- Nerūkantys ar rūkę asmenys, kurių rūkymo intensyvumas mažiau kaip vienas pakelis per dieną ir ne ilgiau nei penkeri metai. Tiriamųjų amžius –

nuo 40 iki 70 metų.

- Visi tiriamieji bent vieną mėnesį iki tyrimo nesirgo ūmine kvėpavimo takų infekcija.

Pacientai, remiantis alergologinės anamnezės duomenimis (dusulį provokuojantys veiksniai) bei alerginių odos dūrio mėginių tyrimo duomenimis, suskirstyti į dvi grupes: sergančius alergine astma (žinomi dusulį provokuojantys alergenai, nustatytas išsijautrinimas bent vienam tirtam alergenui,  $n=21$ ) ir sergančius nealergine astma ( $n=20$ ).

**Odos dūrio mėginiai.** Tiriamųjų išsijautrinimas aplinkos alergenams tirtas ir vertintas remiantis alerginių odos dūrio mėginių su standartiniais namų dulkių erkės *Dermatophagoides pteronyssinus*, 12 žolių žiedadulkių mišinio, piktžolių mišinio, mikroskopinių grybų ir katės epitelio alergenais (Stallergen, Prancūzija) duomenimis, pagal Lietuvoje galiojančias rekomendacijas (17). Mėginio teigiamai kontrolei naudotas 10 mg/ml histamino tirpalas, neigiamai kontrolei – alergenų diagnostinio tirpalo skiediklis. Mėginys vertintas kaip teigiamas, kai vidutinis papulės dydis didesnis arba lygus 3 mm, didesnis arba lygus 50 proc. histamino sukeltos papulės dydžio.

**Spirometrija.** Plaučių funkcija tirta spirometru „CustoVitM“ (Custo Med, Vokietija). Nustatant didžiausią forsuoto iškvėpimo tūrį per pirmąją sekundę ( $FEV_1$ ), kiekvienas tiriamasis pagal visuotinai priimtą metodiką atliko ne mažiau kaip tris kokybiškus forsuoto iškvėpimo veiksmus (18).

**Bronchų reaktivitymo tyrimas su metacholinu.** Bronchų reaktivitymas tirtas rezervuariniu metodu (Provocations Test I, Pari, Vokietija), pradedant nuo 15  $\mu$ g metacholino ir kas penkias minutes šią dozę didinant du kartus iki suminės į plaučius patenkančios 1929  $\mu$ g dozės (19). Apskaičiuota provokacinė metacholino dozė ( $PD_{20}$ ), sukelianti  $FEV_1$  sumažėjimą 20 proc. palyginus su pradiniu  $FEV_1$ .

**Skreplių indukcija ir citologinis tyrimas.** Skreplių atkosėjimui paskatinti buvo vartojamas skirtingų koncentracijų (3, 4 ir 5 proc.) hipertoninis natrio chlorido tirpalas, skiriamas tiriamiesiems inhaliuoti per ultragarsinį purkštuvą (DeVilbiss Health Care, Somerset, JAV) pagal P. Chanez ir bendraautorių aprašytą metodiką (20). Tyrimo metu kas penkias minutes buvo atliekamas spirometrinis tyrimas  $FEV_1$  matuoti. Tyrimas buvo nutrauktas, kai  $FEV_1$  sumažėjo daugiau kaip 20 proc. palyginus su pradiniais rodmenimis. Po kiekvieno inhaliacijos etapo paciento buvo prašoma atkosėti skreplių į sterilų indelį.

Skrepliai buvo atskiriami nuo seilių priemaišų, sumaišomi su 0,1 proc. ditiotreitolio tirpalu (DTT; Sigma-Aldrich, Vokietija) bei fosfatinio buferio druskos

tirpalu (PBS; Sigma-Aldrich, Vokietija). Suspensija filtruota per nailoninį filtrą (Milipore, North Ryde, NSW, Australija). Mikroskopu (B5 Professional, Motic, Kinija) įvertintas gauto tirpalo ląstelių gyvybingumas, epitelio ląstelių skaičius, bendrasis ląstelių skaičius bei ląstelių kiekis viename grame skreplių. Kokybiškais laikyti tie preparatai, kuriuose gyvųjų ląstelių buvo ne mažiau kaip 50 proc., o epitelinių ląstelių – ne daugiau kaip 20 proc. visų ląstelių. Ląstelių suspensija centrifuguota 10 minučių  $-4^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Atskyrus supernatantą, ląstelės praskiestos fosfatinio buferio druskos tirpalu iki reikiamos koncentracijos  $0,5\text{--}1 \times 10^6$  ląstelių/ml tirpalo, iš kurio, naudojant citocentrifugą (Shandon Southern Instruments, Svitkley, JAV), paruošti ląstelių preparatai. Citologinis gautų preparatų tyrimas atliktas atsitiktinai pasirinktame lauke, mikroskopu skaičiuojant standartizuotu *May-Grünwald-Giemsa* metodu dažytas ląsteles (iki 400 ląstelių regėjimo lauke).

**Statistinė analizė.** Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant „SPSS Version 10.0 for Windows“ programinį paketą. Apskaičiuoti atskirų grupių duomenų vidurkiai ir standartinė vidurkio paklaida. Kiekybinių požymių skirtumo reikšmingumui įvertinti apskaičiuotas t-testas. Paklaidos tikimybė  $p < 0,05$  laikyta ribine statistiniam reikšmingumui įvertinti. Ryšys tarp tirtųjų parametrų nustatytas regresinės analizės metodu taikant Spearmano koeficientą.

### Rezultatai

Tirtųjų pacientų charakteristika pateikiama lentelėje. Abiejų grupių pacientai nesiskyrė amžiumi, pradiniais plaučių funkcijos rodikliais ( $\text{FEV}_1$ ), astmos simptomų trukme bei  $\text{PD}_{20}$ .

Atliekant indukuotų skreplių tyrimą, nustatyta, kad pacientų, sergančių nealergine astma, skrepliuose

buvo reikšmingai didesnis bendrasis ląstelių, neutrofilų ir limfocitų kiekis palyginus su sergančiųjų alergine astma analogiškais duomenimis (1 pav).

Eozinofilų bei makrofagų kiekis indukuotuose skrepliuose reikšmingai nesiskyrė. Indukuotų skreplių preparatas pateikiamas antrame paveiksle.

Vertinant indukuotų skreplių ląstelių sudėties sąsajas su bronchų reaktyvumo pokyčiais, nustatyta sąsaja tarp limfocitų ir  $\text{PD}_{20}$  sergant nealergine astma ( $R_s = 0,41$ ,  $p < 0,05$ ), kitų ląstelių sąsajos su  $\text{PD}_{20}$  nerasta (3 pav).

Alergine astma sergančiųjų grupėje nustatyta sąsaja tarp eozinofilų kiekio skrepliuose ir  $\text{PD}_{20}$  ( $R_s = 0,71$ ,  $p < 0,05$ ), o sąsajos tarp kitų ląstelių ir  $\text{PD}_{20}$  nerasta (4 pav).

Atliekant skreplių indukciją, šalutinių reakcijų nebuvo. Visi indukuotų skreplių mėginiai buvo kokybiški: ląstelių gyvybingumas alergine astma sergančiųjų tiriamųjų mėginiuose buvo  $62,72 \pm 2,07$  proc., sergančiųjų nealergine astma –  $62,82 \pm 1,91$  proc.

### Rezultatų aptarimas

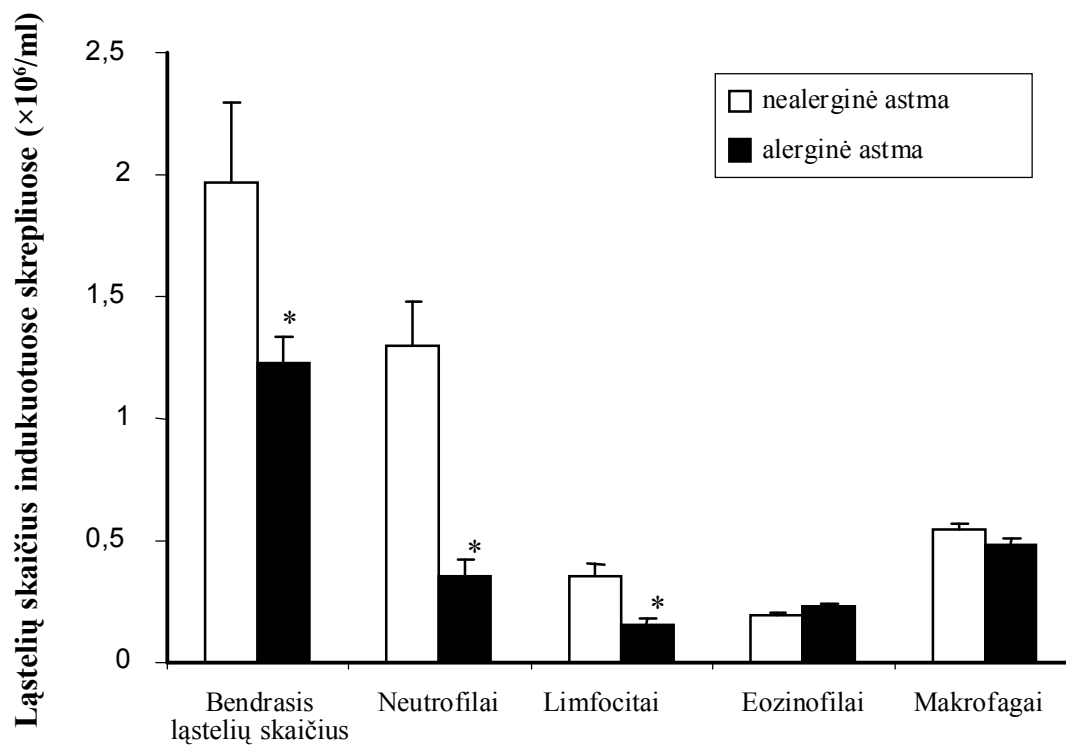
Įvertinome alergine ir nealergine astma sergančių pacientų indukuotų skreplių ląstelių sudėtį, kuri rodo kvėpavimo takų uždegiminius pokyčius. Šio tyrimo duomenys rodo, kad patomorfologiškai astma nėra vienaalytė liga, t. y. alerginė ir nealerginė astma tarpusavyje skiriasi persistuojančio uždegimo pobūdžiu.

Modeliuodami tyrimo eigą, atkreipėme dėmesį į tai, kad iki devintojo dešimtmečio atliktuose tyrimuose uždegimo mechanizmai astma sergantiems pacientams dažniausiai buvo tiriami naudojant invazinius tyrimo metodus: bronchoskopiją, bronchų gleivinės biopsiją ar bronchoalveolinį lavažą, todėl tai apribodavo galimybę ištirti vyresnius ir sunkesne astma sergančius pacientus. Šio tyrimo metu naudojome neinvazinio

**Lentelė. Tirtų asmenų pagrindinės charakteristikos**

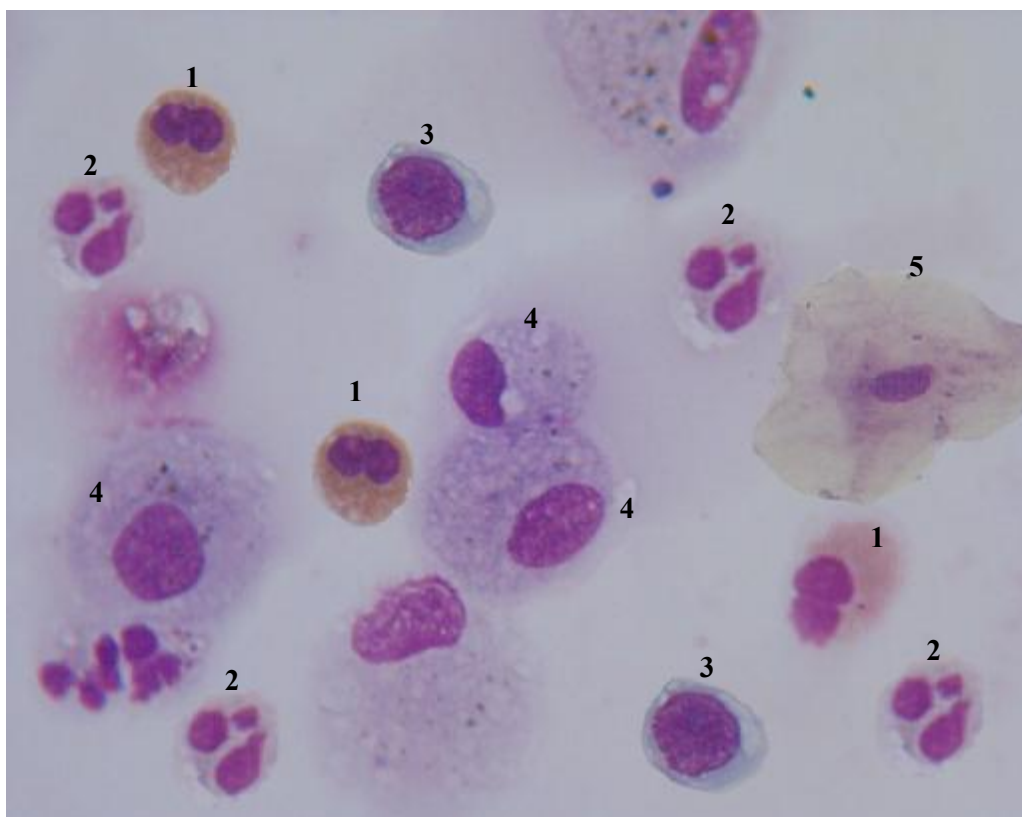
| Charakteristika                                  | Alerginė astma<br>(n=21) | Nealerginė astma<br>(n=20) |
|--------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Amžius (metai)                                   | $51,8 \pm 1,5$           | $51,3 \pm 1,5$             |
| Vyrai/moterys                                    | 9/12                     | 10/10                      |
| Pradinis $\text{FEV}_1$ (l)                      | $3,53 \pm 0,1$           | $3,77 \pm 0,5$             |
| Pradinis $\text{FEV}_1$ (proc. būtiniojo dydžio) | $98,0 \pm 4,5$           | $90,0 \pm 3,1$             |
| Astmos simptomų trukmė (metai)                   | $3,5 \pm 0,9$            | $4,1 \pm 1,2$              |
| $\text{PD}_{20}$ (mg metacholino)                | $0,13 \pm 0,02$          | $0,11 \pm 0,04$            |

$\text{FEV}_1$  – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę;  $\text{PD}_{20}$  – provokacinė metacholino dozė, sukelianti  $\text{FEV}_1$  sumažėjimą 20 proc. palyginti su pradiniu dydžiu.



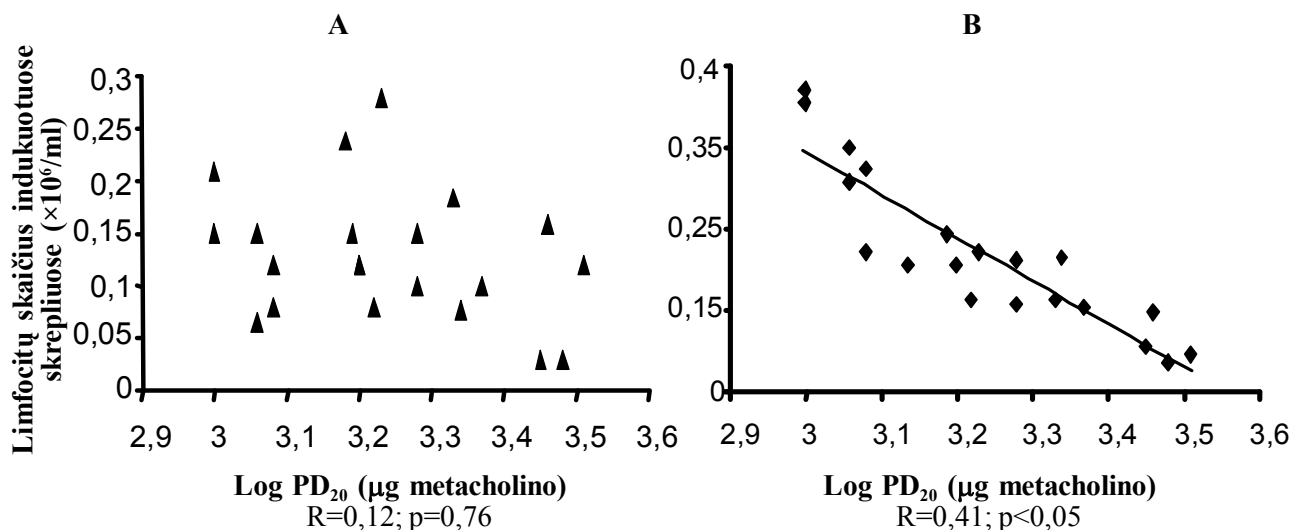
**1 pav. Indukuotų skreplių ląstelių sudėtis sergant alergine ir nealergine astma**

\*  $p < 0,01$  lyginant abiejų grupių tyrimų duomenis.

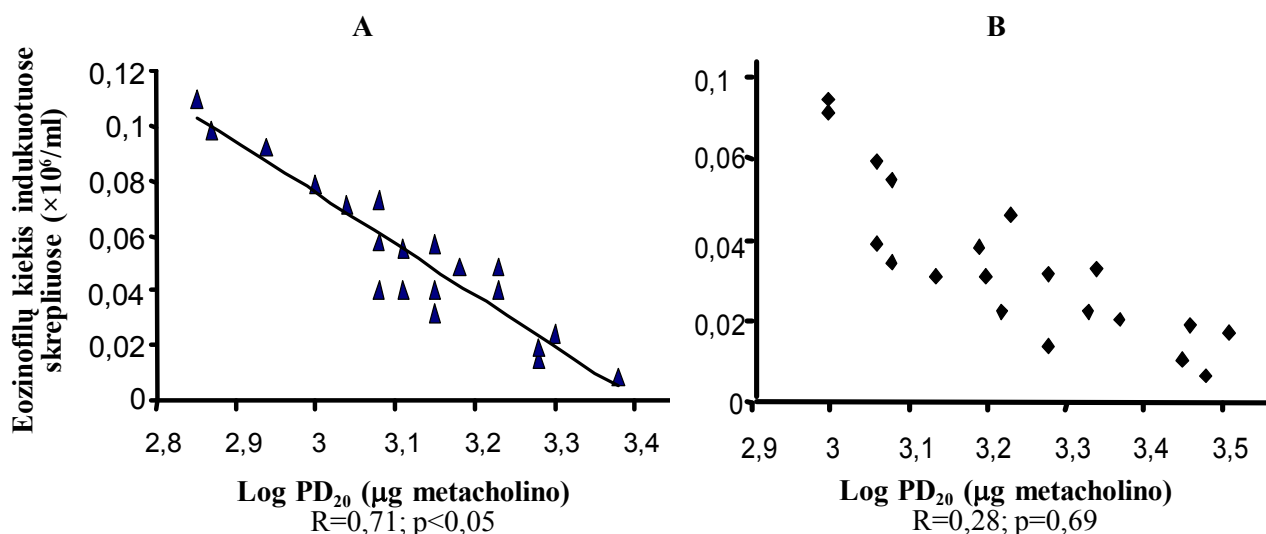


**2 pav. Indukuotų skreplių mėginio, dažyto May-Grünwald-Giemsa metodu, nuotrauka (padidinimas – 1000 kartų)**

1 – eozinofilai, 2 – neutrofilai, 3 – limfocitai, 4 – makrofagai, 5 – epitelio ląstelė.



3 pav. Sąsaja tarp limfocitų kiekio indukuotuose skrepliuose ir  $PD_{20}$   
sergant A – alergine astma, B – nealergine



4 pav. Sąsaja tarp eozinofilų kiekio indukuotuose skrepliuose ir  $PD_{20}$   
sergant A – alergine, B – nealergine astma

tyrimo, t. y. skreplių indukcijos metodiką, kurią naudojant tirti vyresnio amžiaus pacientai. Įvertinę skreplių indukcijos eigą tyrimo metu, hipertoniinio NaCl tirpalo poveikį kvėpavimo funkcijai ( $FEV_1$ ) ir gautų mėginių kokybę bei gautus duomenis palyginę su pasaulyje atliktų analogiškų tyrimų duomenimis (21, 22), galime teigti, kad indukuotų skreplių tyrimas yra saugus ir efektyvus, siekiant įvertinti astma sergančių pacientų kvėpavimo takų uždegiminius pokyčius nepriklausomai nuo tiriamųjų amžiaus.

Šio tyrimo duomenimis, nealerginės astmos metu vyraujančios ląstelės yra neutrofilai ir limfocitai. Ilgą

laiką astmos patomorfologiją tyrinėję mokslininkai nurodydavo, kad viena svarbiausių ląstelių astmos uždegimo metu yra eozinofilas (7, 9). Tačiau daugumos tyrėjų nebūdavo atsižvelgiama į astmos pobūdį, įsijautrinimą alergenams. Šią nuomonę pakeitė S. E. Wenzelis su bendraautoriais 1997 metais paskelbę tyrimų duomenis, rodančius, kad sunkia astma sergančių pacientų bronchų sekrete vyrauja ne eozinofilai, bet neutrofilai (23). Vėliau kiti mokslininkai įrodė, kad neutrofilų kiekis bronchų sekrete didėja ir astmos paūmėjimo metu (24). P. G. Gibsonas su bendraautoriais įrodė, kad ir nesunkios eigos astmos metu

indukuotuose skrepliuose gali vyrauti ir neutrofilai. Tačiau šių tyrėjų tyrime dalyvavę astma sergantys pacientai buvo gydyti inhaliuojamaisiais gliukokortikoidais, kurie, sumažindami neutrofilų apoptozę, galėjo netiesiogiai padidinti jų skaičių kvėpavimo takuose (25). Todėl tyrėjai negalėjo paneigti nuomonės, kad pacientų bronchų sekrete rasta neutrofilija yra gydymo pasekmė. O mūsų atlikto tyrimo metu pacientams nebuvo skiriama nei vietinio, nei sisteminio poveikio gliukokortikoidų, todėl ląstelių sudėtis skrepliuose išliko nepakitusi.

Svarbu ir tai, jog nustatyta sąsaja tarp indukuotų skreplių ląstelių sudėties ir astmos patofiziologinių pokyčių. Iki šiol tyrėjų buvo nustatomos skirtingos sąsajos tarp padidėjusio bronchų reaktyvumo ir ląstelių bronchų sekreto sudėties (26, 27). R. Louis ir bendraautorių atlikto tyrimo duomenys, kaip ir mūsų gauti duomenys rodo reikšmingą ryšį tarp bronchų hiperreaktyvumo ir eozinofilų kiekio alergine astma sergantiems pacientams (28). Neutrofilų vaidmuo bronchų hiperreaktyvumo vystymuisi dar nėra visiškai aiškus. Pastaraisiais metais atliktų eksperimentinių tyrimų duomenys rodo, kad egzistuoja sąsaja tarp

bronchų hiperreaktyvumo ir I tipo T limfocitų pagalbininkų bei tarp bronchų hiperreaktyvumo ir neutrofilų (29). Tačiau šiai hipotezei patvirtinti reikia atlikti daugiau tyrimų.

Manoma, kad būtent patomorfologiniai ir patofiziologiniai astmos formų skirtumai lemia skirtingą atsaką į įprastinį gydymą (30). Tik ištyrus astmos uždegimą reguliuojančius mechanizmus ir jų skirtumus sergant alergine ir nealergine astma bus galima sukurti naujus specifinius ir veiksmingus vaistus šiai ligai gydyti.

### Išvados

Atlikus tyrimą, nustatyta sąsaja tarp pakitusio bronchų reaktyvumo ir limfocitų skaičiaus nealergine astma sergančių pacientų indukuotuose skrepliuose, taip pat nustatytas reikšmingas ryšys tarp eozinofilų skaičiaus skrepliuose bei  $PD_{20}$  sergant alergine astma. Remiantis šiais duomenimis, galima teigti, kad skirtingų astmos formų patogenezėje reikšmingą vaidmenį atlieka skirtingos ląstelės.

Indukuotų skreplių tyrimas saugus ir efektyvus, norint įvertinti kvėpavimo takų uždegiminius pokyčius.

## Peculiarities of induced sputum inflammatory cell counts in allergic versus non-allergic asthma

Algirda Krisiukėnienė<sup>1</sup>, Brigita Šitkauskienė<sup>1, 2</sup>, Kęstutis Malakauskas<sup>1</sup>, Raimundas Sakalauskas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pulmonology, Institute for Biomedical Research, Kaunas University of Medicine,

<sup>2</sup>Department of Pulmonology and Immunology, Kaunas University of Medicine, Lithuania

**Key words:** allergic asthma, non-allergic asthma, induced sputum, inflammatory cell counts.

**Objective.** According to the Global Initiative for Asthma (GINA, updated 2004), although non-allergic asthma has a different clinical profile than allergic asthma, it is not a distinct immunopathological entity. We aimed to investigate the peculiarities of inflammatory cell counts in induced sputum from patients with allergic and non-allergic asthma.

**Methods.** We investigated 41 steroid naive patients (mean age  $51.8 \pm 1.5$  years) with mild persistent asthma. Depending on the results of allergic anamnesis and skin prick test, patients were divided into the two groups: 21 – with allergic asthma, 20 – with non-allergic asthma. Spirometry, bronchial provocation test with methacholine ( $PD_{20}$ ) and sputum induction with hypertonic saline were performed. Cytospins of induced sputum were stained with May-Grünwald-Giemsa for differential cell counts.

**Results.** In samples from non-allergic asthmatics we detected a significantly higher number of total cells ( $1.97 \pm 0.33$  vs  $1.23 \pm 0.11 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p < 0.01$ ), neutrophils ( $1.34 \pm 0.18$  vs  $0.41 \pm 0.06 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p < 0.01$ ) and lymphocytes ( $0.36 \pm 0.04$  vs  $0.15 \pm 0.03 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $p < 0.01$ ), than in samples from allergic asthmatics. Number of eosinophils and macrophages did not significantly differ between two groups. In non-allergic asthmatics, number of lymphocytes correlated with  $PD_{20}$  ( $R_s = 0.41$ ,  $p < 0.05$ ); in allergic asthmatics, number of eosinophils in induced sputum correlated with  $PD_{20}$  ( $R_s = 0.71$ ,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** Our data suggest that lymphocytes might play a more important role in pathogenesis of non-allergic asthma, while eosinophils – in allergic asthma.

---

Correspondence to A. Krisiukėnienė, Department of Pulmonology and Immunology, Kaunas University of Medicine Hospital, Eivenių 2, 50009 Kaunas, Lithuania. E-mail: algirda@takas.lt

## Literatūra

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NIH publication No. 02-3659. Global Initiative for Asthma. National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute; 2002.
2. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-45.
3. Šitkauskienė B, Sakalauskas R. Bronchų astmos patofiziologija. Šiuolaikinė samprata. (Pathophysiology of asthma: contemporary comprehension.) *Medicina (Kaunas)* 2001;9: 850-5.
4. Busse WW, Lemanske RFL. Asthma. *N Engl J Med* 2001;5: 350-62.
5. Rackeman FM. A working classification of asthma. *Am J Med* 1947;33:601-6.
6. Johansson SG, Hourihane JO, Bosquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. Position paper. A revised nomenclature of allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;56:813-24.
7. Šitkauskienė B, Sakalauskas R, Malakauskas K, Lötvall J. Reversibility to a  $\beta_2$ -agonist in COPD: relationship to atopy and neutrophil activation. *Respir Med* 2003;97:591-8.
8. Amin K, Ludvigsdottir D, Jonson C, Nettelblad O, Gudbjornsson E, Valtysdottir S, et al. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2295-300.
9. Wolley K, Gibson P, Carty K, Wilson A, Twaddell S, Wolley M. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:237-43.
10. Kraneveld AD, van der Kleij HP, Kool M, van Houwelingen AH, Weitenberg AC, Redegeld FA, et al. Key role of mast cells in nonatopic asthma. *J Immunol* 2002;169:2044-53.
11. Ludvigsdottir D, Janson C, Högmán M, Hedenström H, Björnsson E, Boman G. Exhaled nitric oxide and its relationships to airway responsiveness and atopy in asthma. *Respir Med* 1999;93:552-6.
12. Ludvigsdottir D, Janson C, Hedenström H, Björnsson E, Boman G, Stralenheim G, et al. Different airway responsiveness profiles in atopic asthma, nonatopic asthma and Sjögren's syndrome. *Allergy* 2000;55:259-65.
13. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308-17.
14. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1532-9.
15. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov A, Chung K, Barnes PJ. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998;53:91-5.
16. Spanevello A, Migliori GB, Sharara A, Ballardini L, Bridge P, Pisati P, et al. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1138-44.
17. Dubakienė R, Ėmužytė R, Leišytė P, Razauskas E. Alergijos diagnostika *in vivo*. Metodinė mokomoji medžiaga. (Allergy diagnostics *in vivo*. Methodical schoolbook.) Vilnius; 1999.
18. Malakauskas K, Bagdonas A, Ryškus L, Sakalauskas R. Spirometrija: atlikimo metodika ir klinikinė interpretacija. Metodinės rekomendacijos. (Spirometry: methodology and clinical interpretation. Methodical recommendations.) Kaunas; 1998.
19. Klein G, Kohler D, Bauer C. Standardisation of inhalation challenges for measuring the unspecific bronchial inhalation challenge by a reservoir method. *Pneumologie* 1991;45:1-4.
20. Chané P, Holz O, Indz PW, Djukanovic R, Maestrelli P, Sterk PJ. Sputum induction. *Eur Respir J* 2002;20:3-8.
21. De la Fuente PT, Romagnoli M, Godard P, Bousquet J, Chané P. Safety of inducing sputum in patients with asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1127-30.
22. Brinke A, Lange C, Zwinderman AH, Rabe FR, Sterk PJ, Bel EH. Sputum induction in severe asthma by a standardized protocol. predictors of excessive bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:749-53.
23. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:737-43.
24. Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1185-90.
25. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma. Evidence of Neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001; 119:1329-36.
26. Grootendorst DC, Rabe KF. Mechanisms of Bronchial Hyperreactivity in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:77-87.
27. Iredale MJ, Wanklyn SAR, Philips IP, Krausz T, Ind PW. Noninvasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline. *Clin Exp Allergy* 1994;24:940-5.
28. Louis R, Sele J, Henket M, Cataldo D, Bettiol J, Seiden L, Bartsch P. Sputum eosinophil count in a large population of patients with mild to moderate steroid-naïve asthma: distribution and relationship with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *Allergy* 2002;57:907-12.
29. Cui J, Pazdziorko S, Miyashiro JS, Thakker P, Pelker JW, Declercq C, et al. A TH1-mediated airway hyperresponsiveness independent of neutrophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:309-15.
30. American Thoracic Society. Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2341-51.

*Straipsnis gautas 2005 02 28, priimtas 2005 03 24*  
*Received 28 February 2005, accepted 24 March 2005*