

**Katarzyna Górską<sup>1</sup>, Rafał Krenke<sup>1</sup>, Justyna Kościuch<sup>1</sup>, Tadeusz Przybyłowski<sup>1</sup>,  
Joanna Domagała-Kulawik<sup>1</sup>, Katarzyna Hildebrand<sup>1</sup>, Wojciech Baran<sup>2</sup>, Marek Kujawa<sup>3</sup>,  
Ryszarda Chazan<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. med. Ryszarda Chazan

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka Akademii Medycznej w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. med. J. Przybyłowski

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. med. J. Malejczyk

## **Związek pomiędzy wybranymi wskaźnikami zapalenia dróg oddechowych a grubością błony podstawnej u chorych na astmę**

The relationship between markers of airway inflammation and thickness of the basement membrane in patients with asthma

### **Abstract**

**Introduction:** Airway inflammation and remodeling are well recognized features of asthma. Remodeling is usually regarded as a consequence of chronic inflammation, however there are also data suggesting that remodeling is a relatively independent process in asthma. Neither inflammation nor remodeling is a uniform process. Thus the precise relationship between markers of inflammation and different patterns of remodeling are still matter of investigations.

The aim of the study was to assess the relationship between total and differential cell count in induced sputum (IS) and BALF, and thickness of the basement membrane (BM) in patients with stable asthma.

**Material and methods:** 18 patients with asthma (M/F 9/9, mean age  $36 \pm 15$  yrs). Duration of symptoms amounted to  $12.7 \pm 11.5$  years. Patients who have not been treated with steroids for at least 3 months were enrolled to the study. All patients underwent sputum induction and fiberoptic bronchoscopy with BAL and bronchial biopsies. Total and differential cell counts were measured in induced sputum and BALF. Light-microscopic measurements of BM thickness were performed in hematoxylin-eosin stained slides of bronchial wall specimens with semi-automatic software analysis.

**Results:** Mean BM thickness was  $12.9 \pm 2.8 \mu\text{m}$  (range: 8.5–20.7  $\mu\text{m}$ ). Total sputum cell count was  $3.4 \pm 2.7 \times 10^6$  cells/ml, whereas in BALF  $9.7 \pm 10.2 \times 10^6$  cells/ml. There was no correlation between differential cell count in induced sputum and BALF. No significant correlations between BM thickness and total and differential cell count in IS and BALF were observed. There also was no correlation between BM thickness and length of asthma duration or degree of the disease.

**Conclusions:** There was no relationship between BM thickness and total number of cells nor number of eosinophils in BALF and/or IS.

**Key words:** asthma, airway remodeling, basement membrane (BM), bronchoalveolar lavage (BAL), induced sputum

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 363–369**

### **Streszczenie**

**Wstęp:** Zapalenie i przebudowa (remodeling) ścian oskrzeli należą do najbardziej charakterystycznych cech astmy. powszechnie się uważa, że zmiany strukturalne są konsekwencją przewlekłego zapalenia toczącego się w drogach oddechowych. Pojawiają się jednak opinie świadczące o tym, że remodeling i zapalenie są zupełnie odrębnymi procesami.

**Adres do korespondencji:** Katarzyna Górską, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej w Warszawie, ul. Banacha 1a, 02–097 Warszawa

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.03.2007 r.

Copyright © 2007 Via Medica

ISSN 0867–7077

Wciąż trwają badania, które mają na celu ocenę związku między zapaleniem a przebudową oskrzeli.

Celem pracy była próba opisanie zależności pomiędzy badanymi wskaźnikami zapalenia dróg oddechowych a remodelingiem określanym na podstawie grubości błony podstawnej u chorych na astmę w stabilnym okresie choroby.

**Materiał i metody:** Badanie przeprowadzono u 18 chorych na astmę (M/K 9/9, średni wiek badanych  $36 \pm 15$  lat). Czas trwania objawów wynosił  $12,7 \pm 11,5$  roku. Chorzy nie stosowali leków przeciwzapalnych przez okres co najmniej 3 miesięcy poprzedzających włączenie do badania. U każdego chorego przeprowadzono indukcję płwociny i badanie bronchofiberoskopowe z BAL i pobieraniem wycinków z oskrzeli. Oceniano liczbę całkowitą i skład komórkowy płwociny i BALF. Grubość błony podstawnej oceniano po zabarwieniu preparatów hematoksyliną i eozyną w mikroskopie świetlnym, przy użyciu programu komputerowego.

**Wyniki:** Grubość błony podstawnej w uzyskanych wycinkach błony śluzowej oskrzeli wyniosła średnio  $12,9 \pm 2,8 \mu\text{m}$  (zakres: 8,5–20,7  $\mu\text{m}$ ). Całkowita liczba komórek w płwocinie wynosiła  $3,4 \pm 2,7 \times 10^6/\text{ml}$ , natomiast w BALF  $9,7 \pm 10,2 \times 10^6/\text{ml}$ . Nie stwierdzono korelacji pomiędzy składem komórkowym płwociny i BALF. Nie wykazano także żadnej korelacji między grubością błony podstawnej a składem komórkowym indukowanej płwociny i BALF. Grubość błony podstawnej nie korelowała z czasem trwania czy stopniem nasilenia choroby.

**Wnioski:** W grupie chorych na astmę nie stwierdzono korelacji pomiędzy grubością błony podstawnej a całkowitą liczbą komórek ani też liczbą eozynofików w BALF i/lub płwocinie indukowanej.

**Słowa kluczowe:** astma, remodeling dróg oddechowych, błona podstawna, płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL), płwocina indukowana

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 363–369

## Wstęp

W świetle obecnych poglądów zarówno zapalenie, jak i przebudowa (remodeling) ścian oskrzeli należą do najbardziej charakterystycznych elementów patomechanizmu astmy. Choć pierwsze spostrzeżenia świadczące o przewlekłym zapaleniu i możliwej przebudowie dróg oddechowych w przebiegu astmy poczyniono już na początku lat 20. ubiegłego stulecia, to rzeczywisty postęp wiedzy w tym zakresie był uwarunkowany wprowadzeniem przyżyciowych badań endoskopowych i biopsyjnych u chorych na astmę [1]. Burzliwy rozwój tych metod badawczych nastąpił w latach 90. XX wieku. W 1989 roku Roche i wsp. opublikowali pierwsze dokładne opisy włóknienia podnabłonkowego w ścianie oskrzeli u chorych na astmę. W toku dalszych badań wykazano, że jest ono tożsame z pogrubieniem struktur błony podstawnej i jest jedną z cech przebudowy ściany oskrzeli, jakie zachodzą u chorych na astmę [2]. Kolejne lata przyniosły dalszy postęp wiedzy zarówno o przebiegu procesów zapalnych w ścianie dróg oddechowych, jak i remodelingu ścian oskrzeli. Jednakże wzajemne zależności pomiędzy tymi procesami pozostają w znacznym stopniu niewyjaśnione.

Celem pracy była ocena zależności pomiędzy wybranymi parametrami zapalenia dróg oddechowych, oznaczanych w indukowanej płwocinie i płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*), a remodelingiem dróg oddechowych ocenianym na podstawie grubości błony podstawnej (BM, *basement membrane*) w biopsjach ścian oskrzeli pozyskanych podczas bronchofiberoskopii.

## Materiał i metody

Badanie przeprowadzono u 18 chorych na astmę (9 kobiet, 9 mężczyzn). Średni wiek badanych wynosił  $36 \pm 15$  lat. Najczęstszym i obecnym u wszystkich chorych objawem choroby były epizody duszności ze świszczącym oddechem. Czas od pojawienia się objawów wahał się od roku do 40 lat, średnio  $20 \pm 12$  lat. Chorzy nie stosowali leków przeciwzapalnych przez okres co najmniej 3 miesięcy poprzedzających włączenie do badania.

Dwie osoby aktualnie paliły tytoń (średnia ekspozycja na dym  $29 \pm 29$  paczkolet). Spośród 6 osób, które paliły w przeszłości (średnio  $6,9 \pm 7,4$  paczkolet), najkrótszy okres abstynencji wynosił 2 lata. U 14 chorych (78%) wykazano cechy alergii (atopii); u pozostałych osób nie udało się wykazać udziału mechanizmów alergicznych. Średnia wartość należna natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej ( $FEV_{1, \text{forced expiratory volume in one second}}$ ), wyrażonej w procentach ( $FEV_1\%$  w.n.), wyniosła  $79\% (\pm 18)$ , średnia wartość natężonej pojemności życiowej (FVC, *forced vital capacity*) (FVC% w.n.) wyniosła  $98,5\% (\pm 11,1)$ , a wskaźnika  $FEV_1/FVC$  —  $68,7\% (\pm 8,8)$ . Charakterystykę badanej grupy przedstawiono w tabeli 1.

Każdy chory podpisał świadomą zgodę na udział w badaniu. Praca jest częścią projektu badawczego, który uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Warszawie (nr 172/2003).

W celu dokonania precyzyjnej charakterystyki badanej grupy przed kwalifikacją do indukcji płwociny i badań bronchofiberoskopowych u każdego chorego przeprowadzono następujące badania: wywiad i badanie przedmiotowe, radiogram

**Tabela 1. Charakterystyka badanej grupy chorych****Table 1. Demographic data of the study group**

Płeć (M/K) <i>Gender M/F</i>	9/9
Wiek (lata) <i>Age (years)</i>	36 ± 15
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24 ± 3
Początek objawów (rz.) <i>Onset of symptoms (age)</i>	16 ± 20
Czas trwania objawów (lata) <i>Duration of symptomatic illness (years)</i>	13 ± 12
Atopia [n (%)] <i>Atopy [n (%)]</i>	14 (78)
Palenie tytoniu [n (%)] <i>Smoking history [n (%)]</i>	8 (44)
aktualnie [n (%)] <i>current smokers [n (%)]</i>	2 (11)
liczba paczolat (w grupie palących) <i>packyears (in current and former smokers)</i>	12 ± 16
FEV <sub>1</sub> I (% w.n.)	3,0 ± 1,1 (79 ± 18)

FEV<sub>1</sub> % w.n. (*forced expiratory volume in one second*) — średnia wartość należąca do danej grupy; wydechowa pierwszosekundowa; BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała

klatki piersiowej, badanie spirometryczne z rejestracją krzywej przepływu–objętość (Lung Test 1000, MES, Polska) i testem odwracalności obturacji zgodnie z wytycznymi *European Respiratory Society* (ERS) [3], test nadreaktywności oskrzeli z metacholiną, alergiczne testy skórne (*prick-test*) oraz ocenę całkowitego stężenia IgE w surowicy. Rozpoznanie astmy i stopnia jej ciężkości dokonywano zgodnie z wytycznymi Światowej Strategii Rozpoznawania, Leczenia i Prewencji Astmy (GINA, *Global Initiative for Asthma*) 2002 [4].

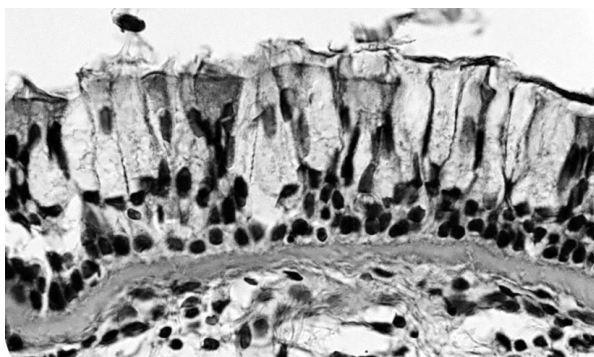
Do indukcji płwociny użyto hipertonicznych roztworów chlorku sodu (NaCl), zgodnie ze standardami zalecanymi przez ERS [5]. Inhalację wyżej wymienionych roztworów poprzedzano wykonaniem spirometrii, a następnie inhalacją leku rozszerzającego oskrzela (salbutamol, 400 µg). Do wytworzenia aerozolu zawierającego kolejno wzrastające stężenia jałowego NaCl (0,9, 3 i 4,5%) wykorzystano nebulizator ultradźwiękowy DeVilbiss 2000 o ustalonej wydajności 1 ml/minutę. Czas inhalacji aerozolu o kolejnym stężeniu wynosił 5 minut. Podczas każdej zmiany stężenia inhalowanego roztworu za pomocą badania spirometrycznego (krzywa przepływu–objętość) monitorowano czynność układu oddechowego. Indukcja była przerywana, gdy chory wykrztusił wystarczającą objętość płwociny (minimum 2 ml) lub wystąpiło

obniżenie FEV<sub>1</sub> o 20% lub więcej w porównaniu z wartością wyjściową (podstawę stanowiła wartość FEV<sub>1</sub> po podaniu salbutamolu). Uzyskaną płwocinę opracowywano zgodnie z wcześniej opisaną procedurą [6]. Skład odsetkowy obliczano w rozmazach barwionych metodą May-Grünwald-Giemsa na podstawie 300 komórek z różnych pól widzenia. Warunkiem uznania płwociny za materiał diagnostyczny była obecność nie więcej niż 50% komórek nabłonkowych i powyżej 200 nienabłonkowych komórek w preparacie. Zabieg bronchofiberoskopii przeprowadzano w znieczuleniu miejscowym (2-procentowa lidokaina) po wcześniejszej premedykacji (400 µg salbutamolu wziewnie, 0,5 mg atropiny *i.m.* i 10 mg diazepamu *i.m.*). Badanie wykonano przy użyciu bronchofiberoskopu (11004 BC, Storz, Niemcy), zgodnie z procedurą opisaną we wcześniejszej publikacji [7]. Podczas badania, po dokonaniu makroskopowej oceny drzewa oskrzelowego, w pierwszej kolejności wykonywano BAL (4 × 50 ml jałowej, ogrzanej do temp. 37°C NaCl). Następnie u każdego chorego pobierano wycinki (średnio 3 ± 1) z oskrzeli segmentowych i/lub subsegmentowych z pominięciem oskrzeli płuca środkowego, skąd był pobierany BALF. W czasie zabiegu podawano dotchawiczo tlen i monitorowano wysycenie krwi tętniczej tlenem za pomocą pulsoksymetru (400 HS, TridentMed Polska).

Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego pobierano do jałowych pojemników i umieszczano w łaźni lodowej. Dalsze etapy opracowania BALF realizowano zgodnie z wcześniej opisaną procedurą [8].

Wycinki błony śluzowej oskrzeli umieszczano w 4-procentowym roztworze formaldehydu, kolejno zatapiano w parafinie, a następnie krojono i barwiono metodą klasyczną — hematoksyliną i eozyną. Następnie poddawano je ocenie w mikroskopie świetlnym (powiększenie 400×). Przy użyciu programu komputerowego Multi Scan Base 08.98 CSS Video Frame Grabber dokonywano pomiarów grubości błony podstawnej we wszystkich dostępnych skrawkach, w których można było ocenić komórki nabłonka wraz z rzęskami, błonę podstawną oraz warstwę podnabłonkową (ryc. 1). Oceniano przynajmniej 2 wycinki od każdego chorego, dokonując średnio około 53 (± 16) pomiarów grubości błony podstawnej w odstępach co 20 µm. Przyjęto wartość średnią ze wszystkich obliczeń jako wartość odzwierciedlającą grubość błony podstawnej dla danego chorego, wzorując się na badaniu opublikowanym przez Sullivana i wsp. [9].

Wartości liczbowe przedstawiano jako średnią ± ± odchylenie standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu nieparametrycznego współczynnika korelacji rang Spearmana (r), przyjmując p mniejsze niż 0,05 jako istotne statystycznie.



**Rycina 1.** Mikroskop świetlny (400×). Nabłonek i błona podstawna. Pacjent z umiarkowaną postacią astmy

**Figure 1.** Light-microscop (400×). Epithelium and reticular basement membrane. A patient with moderate asthma

## Wyniki

U połowy badanych chorych ( $n = 9$ ) astmę sklasyfikowano jako przewlekłą umiarkowaną, u 7 osób (39%) rozpoznano astmę przewlekłą lekką, a u 2 (11%) — astmę epizodyczną.

Spośród zbadanych 17 próbek płwociny 11 (65%) zawierało poniżej 50% komórek nabłonkowych, stanowiąc odpowiedni materiał do dalszej analizy. Badanie bronchofiberoskopowe przeprowadzono u wszystkich 18 chorych, uzyskując od każdego chorego BALF i biopaty

ze ścian oskrzeli. Średnia objętość BALF wynosiła  $103,5 \pm 23,5$  ml, natomiast średnia liczba bioptatów błony śluzowej oskrzeli  $3 \pm 1$ . W tabeli 2 zestawiono wyniki badania składu komórkowego płwociny indukowanej i BALF. Nie zaobserwowano istotnych korelacji między składem komórkowym płwociny indukowanej i BALF (tab. 2).

Grubość błony podstawnej w uzyskanych wycinkach błony śluzowej oskrzeli wyniosła średnio  $12,9 \pm 2,8 \mu\text{m}$ .

Nie wykazano korelacji pomiędzy grubością błony podstawnej a stopniem ciężkości astmy, czasem trwania objawów ani nałogiem palenia tytoniu. Średnia grubość błony podstawnej u osób z astmą epizodyczną wyniosła  $13,0 \pm 2,0 \mu\text{m}$ , z astmą przewlekłą lekką —  $12,5 \pm 2,7 \mu\text{m}$ , a umiarkowaną —  $13,2 \pm 3,3 \mu\text{m}$  (NS).

Porównując grubość błony podstawnej oraz całkowitą liczbę i skład komórkowy indukowanej płwociny oraz BALF, nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy tymi wielkościami.

## Omówienie

Znaczący postęp wiedzy o patogenecie, przebiegu zjawisk zapalnych i patologii astmy, jaki dokonał się w ostatnim 20-leciu, był możliwy między innymi dzięki zastosowaniu endoskopowych

**Tabela 2.** Skład komórkowy płwociny indukowanej i BALF w badanej grupie

**Table 2.** Total and differential cell count of induced sputum and BALF in the study group

Zmienna Variable	Płwocina indukowana Induced sputum ( $n = 11$ )	BALF ( $n = 18$ )	Współczynnik korelacji (r) Correlation factor
Liczba komórek ( $\times 10^6$ kom./ml) Total cell count ( $\times 10^6$ cells/ml)	$3,4 \pm 2,7$	$9,7 \pm 10,2$	$r = 0,2$ , NS
Neutrofile (%) Neutrophils (%)	$21 \pm 17$	$6 \pm 4$	$r = -0,4$ , NS
Neutrofile ( $\times 10^6$ kom./ml) Neutrophils ( $\times 10^6$ cells/ml)	$0,7 \pm 1,0$	$0,6 \pm 0,6$	$r = -0,1$ , NS
Limfocyty (%) Lymphocytes (%)	$4 \pm 3$	$13 \pm 12$	$r = 0,4$ , NS
Limfocyty ( $\times 10^6$ kom./ml) Lymphocytes ( $\times 10^6$ cells/ml)	$0,1 \pm 0,1$	$1,9 \pm 5,3$	$r = -0,1$ , NS
Eozynofile (%) Eosinophils (%)	$23 \pm 18$	$5 \pm 10$	$r = 0,2$ , NS
Eozynofile ( $\times 10^6$ kom./ml) Eosinophils ( $\times 10^6$ cells/ml)	$1,0 \pm 1,5$	$0,5 \pm 0,9$	$r = 0,5$ , NS
Makrofagi (%) Macrophages (%)	$52 \pm 22$	$76 \pm 17$	$r = -0,4$ , NS
Makrofagi ( $\times 10^6$ kom./ml) Macrophages ( $\times 10^6$ cells/ml)	$1,5 \pm 0,9$	$6,7 \pm 5,5$	$r = 0,2$ , NS

metod pozyskiwania materiałów z dolnych dróg oddechowych. Liczne dowody świadczące o bezpieczeństwie i dobrej tolerancji takich zabiegów u chorych na astmę przyczyniły się do stopniowej ich akceptacji [10, 11]. Obecnie względy poznawcze, których celem jest badanie mechanizmów astmy, wpływu leków itp., stanowią jedno z niekwestionowanych wskazań do bronchofiberoskopii. W ocenie zjawisk zapalenia i remodelingu dróg oddechowych najczęściej wykorzystuje się badania biopłatów z oskrzeli (biopsje endo- i transbronchialne) oraz płynu z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. Oprócz metod endoskopowych poszukuje się wciąż innych, mniej inwazyjnych metod, które umożliwiłyby śledzenie przynajmniej niektórych aspektów zapalenia dróg oddechowych. Do takich metod należą badania indukowanej plwociny, pomiary stężenia tlenu azotu w powietrzu wydechowym ( $FE_{NO}$ , *fractional concentration of exhaled nitric oxide*) oraz analiza składu kondensatu powietrza wydechowego (EBC, *exhaled breath condensate*) [12]. Nie ma jednakże pełnej zgodności pomiędzy wynikami badań nieinwazyjnych a wynikami badań przeprowadzonych na materiałach bronchoskopowych. Keatings i wsp. nie stwierdzili żadnej korelacji między składem komórkowym plwociny i BALF u chorych na astmę [13].

Również autorzy niniejszego artykułu w swoich badaniach nie stwierdzili korelacji pomiędzy składem komórkowym indukowanej plwociny a składem komórkowym BALF. Przyczyny powyższych rozbieżności są najprawdopodobniej dość złożone, a należą do nich między innymi różnice w odcinku dróg oddechowych, z którego pochodzą komórki, oraz różnice w metodyce pozyskiwania materiału. Wyniki innych opublikowanych badań wskazują na istnienie korelacji pomiędzy wskaźnikami zapalenia dróg oddechowych oznaczanych w różnych materiałach. Pizzichini i wsp. stwierdzili zgodność między liczbą neutrofilów w plwocinie i BALF u osób z łagodną astmą [14]. Wyniki innych badań dowodzą istotnych korelacji pomiędzy liczbą granulocytów kwasochłonnych w plwocinie i BALF [15, 16].

Jak wynika z powyższych przykładów, do oceny zapalenia dróg oddechowych w astmie mogą być stosowane różnorodne materiały i różne metody badawcze. Nieco odmiennie jest w przypadku procesu przebudowy dróg oddechowych. Początkowo uważano, że jest on konsekwencją przewlekłego zapalenia. Dlatego też sądzono, że badanie różnorodnych aspektów zapalenia dróg oddechowych może dostarczyć pośrednich informacji dotyczących remodelingu. Obecnie wiadomo, że

zapalenie i remodeling dróg oddechowych w astmie to w znacznym stopniu niezależne procesy. Wyniki badań immunohistochemicznych oraz badań molekularnych przemawiają za tym, że ważnych mechanizmów leżących u podłoża zmian strukturalnych w oskrzelach można upatrywać w złożonych interakcjach komórek nabłonkowych i mezenchymalnych, które wywierają na siebie wpływ między innymi poprzez licznie wydzielane cytokiny i czynniki wzrostu. Wyniki badań nad tak zwaną troficzną jednostką nabłonkowo-mezenchymalną (EMTU, *epithelial mesenchymal trophic unit*), której pojęcie wprowadził w 2000 roku Holgate, świadczą, że istotną przyczyną remodelingu są nieprawidłowości w przebiegu procesów naprawy uszkodzonego nabłonka oskrzelowego [17].

Nie ulega wątpliwości, że przebudowa dróg oddechowych w astmie jest zjawiskiem złożonym. Złożoność tego procesu uzewnętrznia się zarówno różnorodnością mechanizmów zapoczątkowujących i podtrzymujących proces remodelingu, jak również znacznym zróżnicowaniem morfologicznym zmian w ścianie oskrzeli. Przeprowadzone od lat badania nad anatomiczną przebudową dróg oddechowych u chorych na astmę pozwoliły na wyróżnienie kilku, jak się wydaje, najbardziej typowych jej elementów. Należą do nich: zniszczenie nabłonka oskrzelowego, przerost i rozrost gruczołów śluzowych i komórek kubkowych, pogrubienie błony podstawnej, wzmożona proliferacja fibroblastów i miofibroblastów w błonie podśluzowej, przyrost masy mięśni gładkich oraz rozplem naczyń krwionośnych w ścianie oskrzeli.

Pogrubienie błony podstawnej jest jednym z elementów charakterystycznych dla remodelingu u chorych na astmę, co znajduje odbicie w licznych publikacjach [2, 18, 19]. Większość z nich opiera się na badaniach biopłatów pozyskanych przyżyciowo podczas bronchofiberoskopii. Metoda ta ma swoje ograniczenia. Biopsja endobronchialna sięga w głąb ściany oskrzela jedynie na głębokość kilkuset mikrometrów, a badanie wyinków umożliwia pozyskanie informacji dotyczących nabłonka oskrzeli, błony podstawnej oraz warstwy podnabłonkowej [20]. Ocena zmian zachodzących w całym przekroju dróg oddechowych, a więc także w warstwie mięśniowej, wymaga badań autopsyjnych lub też badań histopatologicznych oskrzeli pozyskanych w wyniku resekcji płuca [21].

Jednocześnie grubość błony podstawnej może być (przy zachowaniu pewnych warunków) łatwo wyrażona w sposób ilościowy, co wpływa w zna-

czący sposób na precyzję przedstawienia wyników. Owe warunki to prostopadła płaszczyzna przekroju błony śluzowej oraz dobre jakościowo wycinki z zachowaną strukturą nabłonka.

W obecnym badaniu dokonywano pomiarów grubości błony podstawnej tylko w tych skrawkach, w których można było ocenić komórki nabłonka wraz z rzęskami, błonę podstawną oraz warstwę podnabłonkową. Wszystkie inne przekroje odrzucano, aby uniknąć zafałszowania oceny grubości błony podstawnej. Dodatkowym czynnikiem ograniczającym możliwość zafałszowania grubości błony była dość znaczna liczba pomiarów dokonanych u każdego chorego ( $53 \pm 16$ ), zgodnie z wnioskami płynącymi z pracy Sullivana [9]. Oprócz mikroskopu świetlnego ocena grubości BM może być także dokonana za pomocą mikroskopii elektronicznej. Dotychczas przeprowadzone badania, w których porównywano jakość pomiarów błony podstawnej w mikroskopie elektronicznym i świetlnym, nie wykazały istotnych różnic między tymi dwiema metodami pomiaru [22]. W tej sytuacji do oceny grubości błony podstawnej autorzy artykułu wybrali mikroskopię świetlną jako metodę sprawdzoną, tańszą i powszechnie stosowaną. Średnia grubość błony podstawnej u badanych chorych wynosiła  $12,9 \pm 2,8 \mu\text{m}$  i była zbliżona do wartości podawanych przez innych autorów.

Wyniki opublikowanych dotychczas badań wskazują bowiem, że średnia grubość tej struktury u chorych na astmę waha się w granicach  $3,8\text{--}23,1 \mu\text{m}$ . W większości badań dowiedziono także, że grubość błony podstawnej u chorych na astmę jest wyraźnie większa w porównaniu z osobami zdrowymi (u których grubość BM wynosi  $2,9\text{--}8,4 \mu\text{m}$ ) [22]. Dodatkowym warunkiem przyjętym w badaniach autorów artykułu było wyłączenie z badanej grupy osób leczonych steroidami wziewnymi. Jego wprowadzenie było konieczne, jeśli założonym celem badania była ocena grubości błony podstawnej oraz niektórych wykładników zapalenia dróg oddechowych w naturalnym przebiegu astmy. Znany jest bowiem wpływ stosowania steroidów (nawet krótkotrwałego) nie tylko na wskaźniki zapalenia, ale także na zmiany strukturalne w drogach oddechowych. Opisano zmniejszenie grubości BM u chorych przyjmujących steroidy wziewne przez 12 tygodni [23], a nawet krócej [18]. Dlatego też do badania kwalifikowano osoby, które nie były leczone glikokortykosteroidami przez przynajmniej 3 miesiące poprzedzające badanie.

Porównanie grubości błony podstawnej nie wykazało istotnych różnic między grupą chorych na astmę lekką czy epizodyczną a umiarkowaną

(odpowiednio  $13,0 \pm 2,0 \mu\text{m}$  vs.  $12,5 \pm 2,7 \mu\text{m}$  vs.  $13,2 \pm 3,3 \mu\text{m}$ , NS). Zależności takiej nie znaleziono także w wynikach innych badań, według których pogrubienie BM obserwowano u chorych z lekką postacią astmy, a także wśród osób z astmą dobrze kontrolowaną lekami [24, 25]. W badaniu de Blica [24] stwierdzono, że grubość błony podstawnej u dzieci chorujących na ciężką astmę i u dzieci bez objawów klinicznych się nie różni. Warto przypomnieć, że cechy przebudowy mogą być obecne nawet u osób, u których nie występują kliniczne objawy choroby. Potwierdzają to wyniki badania, w którym biopsje oskrzeli dzieci z niecharakterystycznymi objawami ze strony układu oddechowego (u których później rozpoznano astmę), wykazały obecność nacieków eozynofilowych i depozycję kolagenu pod nabłonkiem [26]. Cechy pogrubienia błony podstawnej zaobserwowano też u osób z alergicznym nieżytem nosa, u których nie rozpoznawano astmy [27]. Pogrubienie błony podstawnej ujawnione u dzieci z astmą nie różniło się od zmian stwierdzanych w grupie dorosłych chorych na astmę łagodną i ciężką, nie wykazano także korelacji między grubością błony podstawnej a ciężkością i czasem trwania choroby [28]. Znane są jednak także badania, w których wykazano związek pomiędzy nasileniem zmian strukturalnych a stopniem ciężkości i czasem trwania choroby [29].

W badaniu przeprowadzonym przez autorów artykułu próby znalezienia zależności pomiędzy grubością błony podstawnej a składem komórkowym płwociny i/lub BALF nie ujawniły istotnych korelacji. Na podstawie wcześniejszych publikacji autorzy spodziewali się korelacji pomiędzy grubością BM a liczbą eozynofiliów w płwocinie indukowanej i/lub BALF. W badanej przez autorów grupie chorych odsetek eozynofiliów był podwyższony w płwocinie indukowanej, natomiast stosunkowo niewielki w BALF. Według ten Brinke eozynofilia w płwocinie jest jednym z lepszych wykładników determinujących rozwój przetrwałej obturacji w ciężkiej astmie [30]. W badaniach Cui i wsp. wykazano dodatnią korelację pomiędzy grubością błony podstawnej (jako jednego z głównych wykładników remodelingu) a stężeniem eozynofilowego białka kationowego oraz IL-5 w płwocinie chorych na astmę [31]. Wydaje się, że istnieje zależność między stopniem ciężkości astmy a liczbą eozynofiliów i liczbą limfocytów CD4+ obecnych w BALF [32]. Wykazano także korelację między liczbą eozynofiliów i mastocytów w płynie z płukania a stopniem nadreaktywności oskrzeli. Liczba mastocytów korelowała również z grubością błony podstawnej [18].

## Wnioski

W grupie chorych na astmę nie stwierdzono korelacji pomiędzy grubością błony podstawnej a całkowitą liczbą komórek ani też liczbą eozynofików w BALF i/lub płwocinie indukowanej. Nie wykazano również korelacji między grubością błony podstawnej a stopniem nasilenia choroby.

## Piśmiennictwo

- James A. Airway remodeling in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2005; 11: 1–6.
- Roche W.R., Beasley R., Williams J.H., Holgate S.T. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; 11: 520–523.
- Standardized lung function testing. Official statement of the European Respiratory Society. *Eur. Respir. J. Suppl.* 1993; 16: 1–100.
- GINA Global Initiative for Asthma: Global strategy for asthma management and prevention. NHLBI/WHO 2002.
- Djukanovic R., Sterk P.J., Fahy J.V., Hargreave F.E. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur. Respir. J.* 2002; 20 (supl. 37): 1s–2s.
- Domagała-Kulawik J., Maskey-Warzęchowska M., Kraszewska I., Chazan R. The cellular composition and macrophage phenotype in induced sputum in smokers and ex-smokers with COPD. *Chest* 2003; 123: 1054–1059.
- Krenke R., Przybyłowski T., Niemczyk M. i wsp. Wpływ bronchoskopii i płukania oskrzelowo-pęcherzykowego na czynność serca chorych na astmę. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2006; 74: 32–38.
- Safianowska A., Krenke R., Grubek-Jaworska H. i wsp. Oznaczanie enzymu przekształcającego angiotensynę (ACE) w surowicy i w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF) u chorych na sarkoidozę. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1994; 62 (supl. 4): 39–45.
- Sullivan P., Stephens D., Ansari T., Costello J., Jeffery P. Variation in the measurements of basement membrane thickness and inflammatory cell number in bronchial biopsies. *Eur. Respir. J.* 1998; 12: 811–815.
- Djukanovic R., Wilson J.W., Lai C.K., Hargreave F.E., Howarth P.H. The safety aspects of fiberoptic bronchoscopy, bronchoalveolar lavage, and endobronchial biopsy in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143: 772–777.
- Elston W.J., Whittaker A.J., Khan L.N. i wsp. Safety of research bronchoscopy, biopsy and bronchoalveolar lavage in asthma. *Eur. Respir. J.* 2004; 24: 375–377.
- Przybyłowski T. Rola tlenku azotu w diagnostyce chorób alergicznych. *Medycyna po Dyplomie* 2005; 19: 31–32.
- Keatings V.M., Evans D.J., O'Connor B.J., Barnes P.J. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 1997; 52: 372–374.
- Pizzichini E., Pizzichini M.M., Kidney J.C. i wsp. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur. Respir. J.* 1998; 11: 828–834.
- Grootendorst D.C., Sont J.K., Willems L.N. i wsp. Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin. Exp. Allergy* 1997; 27: 769–779.
- Silkoff P.E., Trudeau J.B., Gibbs R., Wenzel S. The relationship of induced-sputum inflammatory cells to BAL and biopsy. *Chest* 2003; 123: 371s–372s.
- Holgate S.T., Davies D.E., Lackie P.M., Wilson S.J., Puddicombe S.M., Lordan J.L. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2000; 105: 193–204.
- Ward C., Pais M., Bish R. i wsp. Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax* 2002; 57: 309–316.
- Bergeron C., Tulic M.K., Hamid Q. Tools used to measure airway remodeling in research. *Eur. Respir. J.* 2007; 29: 596–604.
- Pepe C., Foley S., Shannon J. i wsp. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2005; 116: 544–549.
- Dunnill M.S., Massarella G.R., Anderson J.A. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax* 1969; 24: 176–179.
- Wilson J.W., Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin. Exp. Allergy.* 1997; 27: 351–353.
- Olivieri D., Chetta A., Del Donno M. i wsp. Effect of short-term treatment with low-dose inhaled fluticasone propionate on airway inflammation and remodeling in mild asthma: a placebo-controlled study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155: 1864–1871.
- Blic de J., Tillie-Leblond L., Tonnel A.B., Jaubert F., Scheinmann P., Gosset P. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2004; 113: 94–100.
- van den Toorn L.M., Overbeek S.E., de Jongste J.C., Leman K., Hoogsteden H.C., Prins J.B. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 2107–2113.
- Pohunek P., Roche W.R., Turzikova J., Kudrman J., Roche W.R. Eosinophilic inflammation in the bronchial mucosa of children with bronchial asthma. *Eur. Respir. J.* 1997; 11: 160s (abstract).
- Milanese M., Crimi E., Scordamaglia A. i wsp. On the functional consequences of bronchial membrane thickening. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91: 1035–1040.
- Payne D.N., Rogers A.V., Adelroth E. i wsp. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167: 78–82.
- Chetta A., Foresi A., Del Donno M. i wsp. Airway remodeling is a distinctive feature in asthma and is related to severity of disease. *Chest* 1997; 111: 852–857.
- ten Brinke A., Zwiderman A.H., Sterk P.J., Rabe K.F., Bel E.H. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 744–748.
- Cui M., Chen S., Qiu C., Tao W., Wu F., Tao Y. Relationship between airway remodeling and inflammatory mediators and cytokines in sputum in patients with bronchial asthma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2002; 25: 344–346 (abstract).
- Pohunek P., Warner J.O., Turzikova J., Kudrman J., Roche W.R. Markers of eosinophilic inflammation and tissue remodeling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2005; 16: 43–51.