

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

Medicīnas fakultāte



**HRONISKAS OBSTRUKTĪVAS PLAUŠU SLIMĪBAS (HOPS) PATOĢENĒZES
MOLEKULĀRIE MEHĀNISMI CENTRĀLAJOS UN PERIFĒRAJOS ELPCEĻOS**

Sergejs Isajevs

PROMOCIJAS DARBS

Medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai patoloģijā

Rīgā

2009

Darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedrā, LU Eksperimentālās un klīniskās medicīnas institūtā un Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas centrā

Darba vadītājs: profesors, *Dr. habil. med.*

Immanuel Taivans

LU Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedra

Zinātniskie recenzenti:

Dr. habil. med.

Juris Bērziņš

LU Medicīnas fakultāte, Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Latvijas Onkoloģijas centrs

Prof. Dr. med.

Regīna Kleina

Rīgas Stradiņa Universitāte, Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Patoloģijas centrs

Prof. MD, PhD

Wim Timens

Department of Pathology, University Medical Center
Groningen, Groningen, The Netherlands

Promocijas padomes priekšsēdētāja:

Profesore, *Dr. habil. med.* Renāte Ligere

Aizstāvēšana notiks 2009. gada 17. aprīlī plkst. 11.00

Latvijas Universitātes Medicīnas, bioloģijas un farmācijas nozaru promocijas padomes sēdē Rīgā, Raiņa bulvārī 19, LU Lielajā aulā.

Darbs tapis ar ESF (Eiropas Sociālā fonda) atbalstu



ANOTĀCIJA

Ievads. Hroniskai obstruktīvai plaušu slimībai (HOPS) ir raksturīga progresējoša un neatgriezeniska plaušu funkciju pasliktināšanās, ko izraisa hroniska elpceļu obstrukcija. Elpceļu obstrukciju novērtē, izmantojot spirometriju. HOPS pašlaik ir ceturtais biežākais mirstības cēlonis Eiropā un ASV, taču tiek prognozēts, ka, smēķētāju skaitam pieaugot, 2020. gadā šī slimība būs jau trešais biežākais nāves cēlonis.

Šī darba mērķis ir novērtēt, vai pastāv atšķirības starp iekaisuma procesa mehānismiem centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un vidēji smagas pakāpes HOPS pacientiem.

Darba uzdevumi. Primārais: kvantitatīvi novērtēt iekaisuma šūnu infiltrāciju, nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) un 2. tipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresiju, kā arī T regulatoro limfocītu (Treg) daudzumu centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem, smēķētājiem ar normālu plaušu ventilācijas funkciju (asimptomātiskie smēķētāji) un HOPS pacientiem.

Sekundārais: novērtēt iespējamu korelāciju starp T regulatoro limfocītu, CD8+ T limfocītu, makrofāgu un neitrofilo leukocītu skaitu, kā arī NF- κ Bp65 un HDAC2 ekspresiju pacientiem ar dažādiem elpošanas funkcionālajiem rādītājiem un izsmēķētājiem pakgadiem.

Metodes. Pētījumā tika izmantots histoloģiskais materiāls, ko ieguva no 72 pacientiem, kuriem tika operēts nesīkšūnu plaušu vēzis. Izmeklējamās personas tika iedalītas trijās grupās: nesmēķētāji ar normālu plaušu ventilācijas funkciju (n = 19), smēķētāji ar normālu plaušu ventilācijas funkciju (n = 28) un vidēji smagas pakāpes HOPS pacienti (n = 25). Lai novērtētu centrālos elpceļus, plaušu audu operācijas materiālā izmeklējām segmentāros bronhus, bet perifēro elpceļu analīzei - subpleirālu plaušu audu fragmentu. No tiem tika pagatavoti histoloģiskie preparāti, kurus krāsoja imūnhistoķīmiski, lai parādītu NF- κ Bp65 un HDAC2 ekspresiju, kā arī noteiktu CD8 T limfocītus, neitrofilos leukocītus, makrofāgus un T regulatoros limfocītus.

Rezultāti. Pētījumā noskaidrots, ka gan asimptomātiskajiem smēķētājiem, gan HOPS pacientiem ir raksturīgas iekaisīgas pārmaiņas elpceļos. HOPS pacientiem ir izteiktāka centrālo un perifēro elpceļu infiltrācija ar nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) pozitīvām šūnām, kā arī

CD8 limfocītiem, neitrofilajiem leukocītiem un makrofāgiem salīdzinājumā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem. Savukārt 2. tipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresija HOPS pacientiem ir izteikti nomākta perifērajos elpceļos salīdzinājumā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem.

Pētījums ir parādījis nevienmērīgu iekaisuma šūnu infiltrāciju centrālajos un perifērajos elpceļos. Gan HOPS pacientiem, gan asimptomātiskajiem smēķētājiem neitrofilo leukocītu un CD8 limfocītu infiltrācija ir izteiktāka perifērajos elpceļos, salīdzinājumā ar centrālajiem elpceļiem, bet, savukārt, makrofāgu infiltrācija HOPS pacientiem ir izteiktāka centrālajos nekā perifērajos elpceļos.

Pētījumā konstatējām, ka nukleārā faktora- κ B, 2. tipa histonu deacetilāzes ekspresija un iekaisuma šūnu (CD8 T- limfocītu, neitrofilo leukocītu un makrofāgu) skaits korelēja ar elpošanas funkcionālajiem rādītājiem un izsmēķētājiem pakgadiem centrālajos un perifērajos elpceļos.

Mūsu pētījumā ir parādīts, ka HOPS pacientiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem T regulatoro limfocītu skaits ir palielināts centrālajos elpceļos, kas korelēja ar izsmēķētājiem pakgadiem, savukārt perifērajos elpceļos HOPS pacientiem novērojām to skaita samazināšanos, kas korelēja ar elpceļu obstrukciju.

Secinājumi. Asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem iekaisuma šūnu infiltrācija, NF- κ Bp65 un HDAC2 ekspresija ir atšķirīga centrālajos un perifērajos elpceļos. HOPS pacientiem iekaisīgas izmaiņas ir izteiktākas nekā asimptomātiskajiem smēķētājiem un tās, galvenokārt ir perifērajos elpceļos. Asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem T regulatoro šūnu (Treg) ir vairāk centrālajos nekā perifērajos elpceļos. Perifērajos elpceļos HOPS pacientiem perifērajos elpceļos Treg šūnu skaits ir samazināts.

Iegūtie rezultāti parāda nukleārā faktora- κ B un 2. tipa histonu deacetilāzes, kā arī T regulatoro limfocītu nozīmi HOPS patoģenēzē. Tas paver perspektīvas slimības attīstības novērtēšanā un prognozēšanā, diagnostikā un ārstēšanas efektivitātes novērtēšanā, kā arī jaunu farmakoloģisko vielu radīšanā.

ANOTĂCIJA ANGLŪ VALODĀ (ABSTRACT)

Introduction. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by a slowly progressive and irreversible airways obstruction.

Cigarette smoking is implicated as a major risk factor for development of COPD, because approximately 90% of COPD patients are smokers. However, only a minority of smokers develop COPD. The basic reason for this phenomenon is still poorly understood. COPD is the leading cause of morbidity and mortality worldwide.

The aim of our study was to establish whether the nature of inflammatory responses (judged by NF- κ Bp65, HDAC2 expression, and T regulatory cells, as well as CD8⁺ T lymphocytes, neutrophils and macrophages infiltration) could be different in large and small airways of smokers with and without COPD.

The primary objective was to compare nuclear factor- κ Bp65 (NF- κ Bp65) and histone deacetylase 2. type (HDAC2) expression, inflammatory cell (CD8⁺ T lymphocytes, macrophages, and neutrophils) infiltration, and T regulatory cell special arrangement and distribution in large and small airways of nonsmokers, asymptomatic smokers, and COPD patients.

The secondary objective was to analyze the relationship of NF- κ Bp65, HDAC2 expression, inflammatory cell and T regulatory lymphocytes count, airway limitation, and smoked pack years.

Methods. 72 subjects undergoing lung resection for a solitary peripheral non-small cell carcinoma were enrolled in the study. They were subdivided into three groups: 19 subjects were nonsmokers with normal lung ventilation function, 28 subjects were current smokers with normal lung function, and 25 current smokers had moderate COPD. The diagnosis of COPD was established according to the definition of GOLD guidelines. COPD patients had $FEV_1/FVC < 70\%$ and $50\% < FEV_1 < 80\%$ of the predicted. The lung tissue specimens for small airway evaluation were taken from the sub-pleural parenchyma; for large airway evaluation, bronchial rings were taken from the segmental bronchus of the lobe or segment obtained by surgery as far away as possible from the tumour site. Samples were fixed without inflation in 10% neutral buffered formalin, processed and embedded routinely. The histological specimens were stained with NF- κ Bp65, HDAC2, FOXP3 (marker for T regulatory cells), CD8, CD68, and neutrophil elastase antibody.

Results. Our study showed the non-uniform distribution throughout the bronchial tree of inflammatory cells. Both smokers with and without COPD had more CD8+ T lymphocytes and neutrophils in small airways compared to large airways; however, COPD patients had more macrophages in large airways compared to small airways.

COPD patients had increased NF- κ Bp65 expression both in large and small airways compared to asymptomatic smokers and nonsmokers. In addition, COPD patients had decreased HDAC2 expression in both large and small airways compared to nonsmokers and asymptomatic smokers.

There was a negative correlation between the number of NF- κ Bp65-positive cells in large and small airways and FEV₁%, FEV₁/FVC%, and a positive correlation with smoked pack years. A negative correlation between the number of inflammatory cells (macrophages, CD8 lymphocytes, and neutrophils) and FEV₁%, FEV₁/FVC% was observed.

Smokers with normal lung function and COPD patients had increased numbers of T regulatory cells in large airways compared to nonsmokers. A positive correlation was observed between T regulatory cells in large airways and smoked pack years.

In contrast, COPD patients had decreased numbers of T regulatory cells in small airways compared to asymptomatic smokers and nonsmokers, which negatively correlated with airflow obstruction.

Conclusion. We found non-uniform distribution of inflammatory cells throughout the bronchial tree in asymptomatic smokers and COPD patients. COPD was characterized by increased CD8+ T cells and neutrophils in small airways, but macrophages in large airways, with concomitant upregulation of NF- κ Bp65, but downregulation of HDAC2 which correlated with smoked pack years and airflow limitation.

Both asymptomatic smokers and COPD patients had increased T regulatory cell count in large airways, which correlated with smoking pack years.

In contrast, in small airways of COPD patients, Treg were downregulated, which correlated with airflow limitation.

The present study contributes to a better understanding of the pathogenesis of COPD, opening new vistas in COPD diagnosis and treatment, indicating novel molecular targeting for pharmaceutical drug synthesis.

SAĪSINĀJUMU SKAIDROJUMS / ABBREVIATIONS

SAĪSINĀJUMS	Skaidrojums latviski	Skaidrojums angliiski
AP-1	aktivētājproteīns-1	activator protein-1
B7-1	molekula, ko ekspresē antigēnprezentējošās šūnas, CD28 ligands	cell surface marker expressed by antigen presenting cells, CD28 ligand
B7-2	molekula, ko ekspresē antigēnprezentējošās šūnas, CD152 (CTLA-4) ligands	cell surface marker expressed by antigen presenting cells, CD152, CTLA-4 ligans
BAL	bronhoalveolārā lavāža	bronchoalveolar lavage fluid
CBP	cikliskā adenoziņa monofosfāta saistošais proteīns	cyclic adenosine monophosphate binding protein
CCL- CC	hemotakses hemokīnu ligands	chemotactic chemokine ligand
CLR- C	C-tipa lektīna receptors	C-type lectin receptor
CTLA4	citotoksisko T limfocītu antigēns-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CXCL-CXC	α hemokīna ligands	CXC or α chemokine ligand
EDN	eozinofilo leikocītu neirotoksīns	eosinophil derived neurotoxin
EGF	epitēlija augšanas faktors	epidermal growth factor
EGFR	epitēlija augšanas faktora receptors	epithelial growth factor receptor
ERK	ekstracelulārās signāla regulējošās kināzes	extracellular signal regulated kinases
FEV ₁	forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē	forced expiratory volume in the first second
FEV ₁ /FVC	forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē/forsētā vitālā kapacitāte, Tifno indekss	forced expiratory volume in the first second/forced vital capacity, Tifno test

FGF	fibroblastu augšanas faktors	fibroblast growth factor
fos	šūnu protoonkogēns, transkripcijas faktors	protooncogene, transcription factor
FOXP3	"spārnains, dakšveida" gēns, T regulatoro limfocītu specifisks marķieris, transkripcijas faktors	forkhead box P3 gēns
GATA3	transkripcijas faktors, kas saistās ar specifisku DNS sekvenci- guanīnu (guanine, G), adenīnu (adenine, A) un tiamīnu (thymine, T)	transcription factor, which binds to specific DNA sequence-guanine, adenine and thymine
G-CSF	granulocītu kolonijstimulējošais faktors	granulocytes colony-stimulating factor
γ -GSC	γ -glutamilsteīna sintēze	γ -glutamylcysteine synthetase
γ -GT	γ glutamiltranspeptidāze	γ -glutamyl transpeptidase
GITR	glikokortikoīdu stimulēts tumora nekrozes faktora receptors	glucocorticoid- induced tumor necrosis factor receptor
GOLD	HOPS vadlīnijas	global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GM-CSF	Faktors, kas stimulē granulocītu un makrofāgu koloniju veidošanos	granulocytes and macrophages colony-stimulating factor
GRO	augšanas faktora receptora līdzīgais onkogēns	growth factor receptor related oncogene
HAT	histona acetiltransferāze	histone acetyltransferase
HOPS	hroniska obstruktīva plaušu slimība	chronic obstructive pulmonary disease, COPD
HDAC2	histona deacetilāze-2	histone deacetylase-2
HOCl	hipohlorskābe	hypochlorous acid
HSP	karstuma šoka proteīns	heat shock protein
ICAM-1	intracelulārā adhēzijas molekula-1	intracellular adhesion molecule-1
IFN- γ	interferons- γ	interferon- γ
IDO	indolamīna-2,3-dioksigenāze	indoleamine-2,3-dioxygenase
IL	interleikīns	interleukin
IP-10	interferona γ indukcijas proteīns-10	interferon γ inducible protein-10

I-TAC	interferonu inducētais T šūnu hemotakses faktors	interferon induced T cell chemotactic factor
jun	gēns un proteīns	gene and protein
JNK	jun-N-terminālā kināze	Jun-N-terminal kinase
Lag-3	limfocītu aktivācijas gēns-3	lymphocyte activation gene-3
LFA-1	ar limfocītu funkciju saistītais antigēns-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LMP-2	lielā multifunkcionālā peptidāze-2	large multifunctional peptidase-2
LTB4	leikotriēns B4	leukotriene B4
LTBP4	latentā transformējošā augšanas faktora beta -4 saistošais proteīns	latent transforming growth factor beta binding protein-4
MAPK	mitogēna aktivētās proteīna kināzes	mitogen-activated protein kinase
MBP	galvenais bāziskais proteīns	major basic protein
MCP-1	monocītu hemotakses factors	monocytes chemotactic factor
Mig	monokīnu inducētais interferons	monokine induced interferon
MIP-1 α	makrofāgu iekaisuma proteīns-1 α	macrophage inflammatory protein-1 α
MHC	galvenais histosaderības komplekss	major histocompatibility complex
MMP	matrices metaloproteināze	matrix metalloproteinase
MUC	mucīni	mucins
NADPH	nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāta oksidāze	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NF- κ B	kodola (nukleārais) faktors- κ B	nuclear factor- κ B
NK šūnas	naturālo killeru šūnas (galētājšūnas)	natural killer cells, NK cells
Notch	šūnas transmembrānais receptors	cellular transmembranal receptor
Nrf2	transkripcijas faktors, NF-E2 saistošais faktors	NF-E2-related transcription factor-2

RANTES	IL-8 grupas citokīns, saistīts ar T šūnu aktivāciju, tajās ekspresēts un sekretēts	regulated on activation, normal T cells expressed and secreted
ref-1	reducēšanas faktora proteīns	redox factor protein
ROS	reaktīvie skābekļa radikāļi	reactive oxygen species
PAMP	patogēnu asociētie molekulārie regulējošā tipa signāli	regulatory type pathogen - associated molecular patterns
PAF	trombocītu aktivētāj-faktors	platelet activating factor
PCAF	p300 un p300/CBP asociētais faktors	p300 un p300/CBP associated factor
PRAP	peroksisomas proliferācijas aktivētāj-receptori	peroxisome proliferator-activated receptor
p21 kināze	kināze ar molekulāro masu 21 kDa	kinase with molecular weight 21kDa
PVO	Pasaules Veselības organizācija	World Health organization
SIRT1	sirtuīns, nikotinamīda adenīdinukleotīda atkarīgā deacetilāze	sirtuin, nicotinamide adenine dependent deacetylase
Smad-3	dekapentaplēģiskais homologproteīns-3	mothers against decapentaplegic homolog-3
SMP-30	novecošanas proteīns-30	senescence marker protein-30
SPLI	leikocītu sekretētais proteīnāžu inhibitors	secreted leukocyte protease inhibitor
STAT	signāla transdukcijas un aktivācijas transkripcijas faktors	signal transduction and transcription factor
TATA-box	DNS sekvenca, kas iezīmē transkripcijas sākumu	DNA sequence found in the promoter region of most genes that is involved in the process of transcription
TBP	saistošais proteīns, kas mijiedarbojas ar TATA box	TATA box binding protein
TCR	T šūnu receptors	T cell receptor
TGF-β	transformējošais augšanas faktors-β	transforming growth factor-β

Th	T helperu limfocīti	Th lymphocytes
TLR	Toll līdzīgie receptori	Toll like receptors
Tr1	Tr1 regulatorie limfocīti	Tr1 regulatory lymphocytes
TNF- α	tumora nekrozes faktors α	tumor necrosis factor- α
TRPC	potenciāla atkarīgie jonu kanālu receptori	transient receptor potential channel
TRPV	potenciāla atkarīgie vaniloīda kanālu receptori	transient receptor potential vanilloid channel
TSLP	tīmusa stromas limfopoetīns	thymic stromal lymphopoetin
VC	plaušu vitālā kapacitāte	vital capacity
VCAM-1	vaskulārā adhēzijas molekula-1	vascular adhesion molecule-1
VEGF	vaskulārais augšanas faktors	vascular growth factor
VLA-1	vēlīnais antigēna komplekss-1	very late antigen complex-1

Attēlu saraksts

Numurs	Virsraksts	Lappuse
1	HOPS prevalence dažādos laika posmos	30
2	HOPS izmaksas biljonos ASV dolāru	31
3	Mirstība, sakarā ar HOPS, dažādās Eiropas valstīs 2003. gadā	32
4	Ģenētisko faktoru nozīme HOPS etiopatogēnēzē	39
5	HOPS patoģenēzē iesaistītie mehānismi	44
6	Makrofāgu un elpceļu epitēlija šūnu nozīme HOPS patogēnēzē	52
7	Sistēmisku citokīnu ietekme uz audiem un orgāniem HOPS pacientiem	57
8	NF-κBp65 aktivācija un tai sekojoši procesi	64
9	Histonu deacetilāžu darbības pamatprincipi	69
10	HDAC2 nomākšanas un aktivācijas mehānismi	71
11	nTreg supresīvie efekti uz T efektoršūnām	74
12	Mitrā kamera imūnhistoķīmisko reakciju veikšanai	87
13	Nukleārā faktora-κBp65 (NF-κBp65) pozitīvās šūnas centrālajos un perifērajos elpceļos nesmeķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS).	90
14	NF-κBp65 pozitīvo makrofāgu relatīvais skaits centrālajos un perifērajos elpceļos nesmeķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS)	91
15	NF-κBp65 pozitīvo limfocītu relatīvais skaits centrālajos un perifērajos elpceļos nesmeķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS)	92

16	NF-κBp65 kodola lokalizācija, procentos (%) centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS)	93
17	Korelācija starp FEV ₁ % un NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	94
18	Korelācija starp FEV ₁ /FVC% un NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	94
19	Korelācija starp izsmēķētājiem pakgadiem un NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	95
20	Epitēlija nokrāsošanās intensitāte centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS)	95
21	NF-κBp65 ekspresija nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C) centrālajos elpceļos un nesmēķētājiem (D), asimptomātiskajiem smēķētājiem (E) un HOPS pacientiem (F) perifērajos elpceļos	96
22	2. tipa histonu deacetilāzes (HDAC2) pozitīvās šūnas centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS)	97
23	HDAC2 nokrāsošanās intensitāte bronhu epitēlijā ar hromogēnu (DAB)	98
24	Korelācija starp FEV ₁ % un HDAC2 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	99
25	Korelācija starp FEV ₁ /FVC% un HDAC2 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	99
26	Korelācija starp HDAC2 ekspresiju epitēlija šūnās centrālajos (A) un perifērajos elpceļos un izsmēķētājiem pakgadiem	100
27	HDAC2 ekspresija nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C) centrālajos elpceļos un nesmēķētājiem (D), asimptomātiskajiem smēķētājiem (E) un HOPS pacientiem (F) perifērajos elpceļos	100
28	T regulatorie limfocīti centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS)	101
29	Korelācija starp FEV ₁ % un T regulatorajiem limfocītiem centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	102
30	Korelācija starp izsmēķētājiem pakgadiem un T regulatorajiem limfocītiem centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	102

31	T regulatorie limfocīti nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C) centrālajos elpceļos un nesmēķētājiem (D), asimptomātiskajiem smēķētājiem (E) un HOPS pacientiem (F) perifērajos elpceļos	103
32	CD8 limfocīti centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem.	104
33	Korelācija starp FEV ₁ % un CD8 limfocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	105
34	Korelācija starp FEV ₁ %/FVC un CD8 limfocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos.	105
35	Korelācija starp izsmēķētājiem pakgadiem un CD8 limfocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	106
36	CD8 limfocīti centrālajos elpceļos nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C)	106
37	Neitrofilo leukocītu (Ne) absolūtais skaits centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS)	107
38	Korelācija starp FEV ₁ % un neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	108
39	Korelācija starp FEV ₁ %/FVC un neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	108
40	Korelācija starp izsmēķētājiem pakgadiem un neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	109
41	Neitrofilie leukocīti perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C)	109
42	Makrofāgu (Makr) absolūtais skaits centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS)	110
43	Korelācija starp FEV ₁ % un makrofāgu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	111
44	Korelācija starp FEV ₁ %/FVC un makrofāgu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	111
45	Korelācija starp izsmēķētājiem pakgadiem un makrofāgu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos	112

Tabulu saraksts

Numurs	Virsraksts	Lappuse
1	Ģenētisko faktoru nozīme HOPS patoģenēzē	38
2	Gēni, kurus regulē NF-κB	66
3	Galvenās CD4+ T regulatoro šūnu īpašības, pamatojoties uz to virsmas receptoriem, sekretētiem citokīniem un inhibējošo ietekmi	72
4	Darbā izmantotās primārās antivielas	87
5	Pētījumā iekļauto personu raksturojumi	89

List of figures

Number	Title	Page
1	Prevalence of COPD during last five decades	30
2	The worldwide costs of COPD	31
3	The mortality rate due to COPD in some European countries	33
4	Role of genetic risk factors in COPD etiopathogenesis	39
5	The mechanisms implicated in COPD pathogenesis	44
6	Macrophages and airways epithelial cells in COPD pathogenesis	52
7	The influence of systemic cytokines on different tissue and organs in COPD	57
8	The cascade of NF- κ B activation	64
9	The mechanisms of HDAC2 action	69
10	The mechanisms of HDAC2 deactivation and activation	71
11	The suppressive effects of nTreg on Tcell population	74
12	Humidity chamber for immunohistochemical staining	87
13	The number of nuclear factor- κ Bp65 (NF- κ Bp65) positive cells in large and small airways of in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)	90
14	The relative number of NF- κ Bp65 positive macrophages in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)	91
15	The relative number of NF- κ Bp65 positive lymphocytes in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)	92
16	The NF- κ Bp65 nuclear localization (percentage, %) in the cells of large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)	93

17	The correlation between the number of NF- κ Bp65 positive cells and FEV ₁ % in large (A) and small (B) airways	94
18	The correlation between the number of NF- κ Bp65 positive cells and FEV ₁ /FVC% in large (A) and small (B) airways	94
19	The correlation between the number of NF- κ Bp65 positive cells and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways	95
20	The NF- κ Bp65 epithelial staining intensity in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)	95
21	The NF- κ Bp65 expression in large airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C), and in small airways of nonsmokers (D), asymptomatic smokers (E) and COPD patients (F)	96
22	The number of histone deacetylase-2 (HDAC2) positive cells in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)	97
23	HDAC2 staining intensity of airways epithelium in large and small airways	98
24	The correlation between the number of HDAC2 positive cells and FEV ₁ % in large (A) and small (B) airways	99
25	The correlation between the number of HDAC2 positive cells and FEV ₁ /FVC% in large (A) and small (B) airways	99
26	The correlation between the number of HDAC2 positive cells and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways	100
27	The HDAC2 expression in large airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C), and in small airways of nonsmokers (D), asymptomatic smokers (E) and COPD patients (F)	100
28	The number of T regulatory cells in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)	101
29	The correlation between the number of T regulatory cells and FEV ₁ % in large (A) and small (B) airways	102
30	The correlation between the number of T regulatory cells and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways	102

31	T regulatory cells in large airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C), and in small airways of nonsmokers (D), asymptomatic smokers (E) and COPD patients (F)	103
32	The number of CD8 positive T lymphocytes in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)	104
33	The correlation between the number of CD8 positive T lymphocytes and FEV ₁ % in large (A) and small (B) airways	105
34	The correlation between the number of CD8 positive T lymphocytes and FEV ₁ %/FVC in large (A) and small (B) airways	105
35	The correlation between the number of CD8 positive T lymphocytes and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways	106
36	The CD8+ T lymphocytes in large airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C)	16
37	The number of neutrophils in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD).	107
38	The correlation between the number of neutrophils and FEV ₁ % in large (A) and small (B) airways	108
39	The correlation between the number of neutrophils and FEV ₁ %/FVC in large (A) and small (B) airways	108
40	The correlation between the number of neutrophils and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways	109
41	Neutrophils in small airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C)	109
42	The number of macrophages in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)	110
43	The correlation between the number of macrophages and FEV ₁ % in large (A) and small (B) airways	111
44	The correlation between the number of macrophages and FEV ₁ %/FVC in large (A) and small (B) airways	111
45	The correlation between the number of macrophages and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways	112

List of tables

Number	Title	Page
1	Role of genetic factors in COPD pathogenesis	38
2	The genes that are regulated by NF- κ B	66
3	The peculiarities of CD4+ T regulatory cells	72
4	Used primary antibodies	87
5	Patients characteristics	89

Satura rādītājs

1. Ievads	26
2. Literatūras apskats	28
2.1. Definīcija.....	28
2.2. Epidemioloģija	29
2.3. Skrīninga programmas	33
2.4. Riska faktori	33
2.4.1. Ģenētiskie faktori	34
2.4.2. Fenotipa nozīme HOPS patoģenēzē.....	39
2.4.3. Elpceļu hiperreaktivitāte	40
2.4.4. Plaušu augšana	40
2.4.5. Plaušu novecošana	40
2.4.6. Tabakas dūmi	41
2.4.7. Arodputekļi un ķīmikālijas.....	41
2.4.8. Ārējais un iekštelpu gaisa piesārņojums	42
2.4.9. Infekcijas	42
2.4.10. Sociālais stāvoklis un barojums	42
2.5. HOPS patoģenēze	43
2.5.1. Bronhiālā epitēlija nozīme HOPS patoģenēzē	45
2.5.2. Kausveida dziedzeršūnas, zemgļotādas dziedzeri, gļotu izdalīšanās	47
2.5.3. Neitrofilo leukocītu nozīme HOPS patoģenēzē	48
2.5.4. Eozinofilo leukocītu nozīme HOPS patoģenēzē.....	49
2.5.5. Makrofāgu nozīme HOPS patoģenēzē	50
2.5.6. CD8 limfocītu nozīme HOPS patoģenēzē	52
2.5.7. CD4 limfocītu nozīme HOPS patoģenēzē	53
2.5.8. Elpceļu gludās muskulatūras nozīme HOPS patoģenēzē.....	54
2.5.9. Ekstracelulārā matricsa izmaiņas HOPS pacientiem	54
2.5.10. Apoptoze plaušu šūnās.....	55
2.5.11. Citokīni un hemokīni	55

2.5.11.1. Sistēmiskās darbības citokīni un hemokīni	55
2.5.11.2. Plaušu citokīni un hemokīni	56
2.6. Oksidatīvais stress	58
2.6.1. Reaktīvo skābekļu radikāļu mediēta lipīdu peroksidācija un to nozīme plaušu iekaisumā	58
2.6.2. Antioksidanti	60
2.6.3. γ -glutamilcisteīna sintēzes loma ģenētiski predisponētu plaušu slimību attīstībā	61
2.6.4. Oksidantu stimulēti mitohondriju bojājumi	62
2.6.5. Oksidantu stimulēta ekstracelulārā matricas pārbūve	62
2.6.6. γ -glutamiltanspeptidāzes loma glutaciona līmeņa regulācijā plaušās	63
2.7. Gļotādas tolerances zudums HOPS pacientiem	63
2.8. Nukleārā faktora- κ B aktivācija	64
2.8.1. NF- κ B un gēnu ekspresijas regulācija	66
2.8.2. Aktivētājproteīns-1, AP-1	67
2.9. Mitogēnu aktivēto proteīnkināžu nozīme HOPS patoģenēzē	68
2.10. Histonu deacetilāzes	68
2.10.1. 2. tipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresiju un aktivitāti ietekmējoši faktori	70
2.11. T regulatoro limfocītu nozīme HOPS patoģenēzē	71
2.11.1. Naturālās T regulatorās šūnas	73
2.11.2. FOXP3 un naturālie T regulatorie limfocīti	75
2.11.3. Adaptīvie T regulatorie limfocīti	75
2.11.4. Dendrītisko šūnu nozīme adaptīvu T limfocītu veidošanā	76
2.11.5. T regulatorās šūnas un astma	77
2.11.6. Glikokortikoīdi un T regulatorās šūnas	78
2.11.7. α Treg un gļotādas tolerance	79
2.11.8. T regulatorie limfocīti un higiēnas hipotēze	79
2.11.9. T regulatoro limfocītu nozīme HOPS patoģenēzē	80
2.12. Darba aktualitāte, novitāte hipotēze	83

3. Darba mērķis	84
4. Darba uzdevumi	84
5. Pacientu rakturojums un metodes	85
5.1. Pacientu izvēle	85
5.2. Histoloģiskā un imūnhistoķīmiskā izmeklēšana	85
5.3. Datu statistiskā apstrāde	88
6. Rezultāti	89
6.1. Pacientu raksturojums	89
6.2. Nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) ekspresija centrālajos un perifērajos elpceļos	89
6.3. 2 tipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresija centrālajos un perifērajos elpceļos	97
6.4. T regulatorie limfocīti centrālajos un perifērajos elpceļos	101
6.5. CD8 limfocītu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos	104
6.6. Neitrofilo leukocītu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos	106
6.7. Makrofāgu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos	110
7. Diskusija	113
8. Aizstāvēšanai izvirzītas tēzes	130
9. Secinājumi	131
10. Publikācijas	132
11. Pateicības	137
12. Literatūra	138

Content

1. Introduction	26
2. Review of literature	28
2.1. Definition	28
2.2. Epidemiology	29
2.3. Screening.....	33
2.4. COPD risk factors	33
2.4.1. Role of genetic factors	34
2.4.2. Phenotypic susceptibility	39
2.4.3. Airways hyperresponsiveness	40
2.4.4. Lung growth.....	40
2.4.5. Lung aging	40
2.4.6. Tobacco smoking	41
2.4.7. Occupational dusts and chemicals	41
2.4.8. Outdoor and indoor air pollution	42
2.4.9. Infections.....	42
2.4.10. Socioeconomic status and nutrition	42
2.5. The pathogenesis of COPD.....	43
2.5.1. Bronchial epithelium in COPD pathogenesis	45
2.5.2. Goblet cells, submucosal glands and mucus production.....	47
2.5.3. Neutrophils in COPD	48
2.5.4. Eosinophils in COPD	49
2.5.5. Macrophages in COPD	50
2.5.6. CD8 T-lymphocytes in COPD	52
2.5.7. CD4 T-lymphocytes in COPD	53
2.5.8. Airways smooth muscle in COPD	54
2.5.9. Extracellular matrix changes in COPD.....	54
2.5.10. Apoptosis of lung cells.....	55

2.5.11. Cytokines and chemokines.....	55
2.5.11.1 Systemic cytokines and chemokines.....	55
2.5.11.2 Lung cytokines and chemokines	56
2.6. Oxidative stress.....	58
2.6.1. Oxidant-mediated lipid peroxidation and lung injure	58
2.6.2. Antioxidants	60
2.6.3. The role of γ -glutamylcysteine synthetase in genetic susceptibility to lung diseases	61
2.6.4. Oxidant-induced mitochondrial damage.....	62
2.6.5. Oxidant-stimulated extracellular matrix remodelling.....	62
2.6.6. Role of γ -glutamyl transpeptidase in the regulation of glutathione levels in lungs.....	63
2.7. Mucosal tolerance in COPD	63
2.8. Nuclear factor- κ B activation pathway	64
2.8.1. NF- κ B regulated gene expression.....	66
2.8.2. Activator protein-1, AP-1	67
2.9. Mitogen activated proteine kinases in COPD.....	68
2.10.Histone deacetylases	68
2.10.1. Regulation of HDAC2 expression	70
2.11. Role of T regulatory lymphocytes in COPD.....	71
2.11.1. Natural T regulatory cells	73
2.11.2. FOXP3 and Natural T regulatory cells	75
2.11.3. Adaptive T regulatory cells.....	75
2.11.4. Role of dendritic cells in generating adaptive T regulatory cells	76
2.11.5. T regulatory cells and asthma	77
2.11.6. Glucocorticoids and T regulatory cells	78
2.11.7. aTreg and mucosal tolerance.....	79
2.11.8. T regulatory cells and hygiene hypothesis.....	79
2.11.9. T regulatory cells in COPD.....	80
2.12. Actuality, novelty and hypothesis of the study	83
3. Aim of the study	84

4. Work tasks	84
5. Patients characteristics and methods	85
5.1. Patients characteristics	85
5.2. Histological and immunohistochemical examination	85
5.3. Statistical analysis	88
6. Results	89
6.1. Subjects characteristics	89
6.2. Nuclear factor- κ Bp65 (NF- κ Bp65) expression in large and small airways	89
6.3. Histone deacetylase-2 (HDAC2) expression in large and small airways	97
6.4. T regulatory cells in large and small airways	101
6.5. CD8 T lymphocytes in large and small airways	104
6.6. Neutrophils in large and small airways	106
6.7. Macrophages in large and small airways	110
7. Discussion	113
8. Thesis to defend	130
9. Conclusion	131
10. Publications	132
11. Acknowledgement	137
12. References	138

1. IEVADS

Hroniskai obstruktīvai plaušu slimībai (HOPS) ir raksturīga progresējoša un neatgriezeniska plaušu funkciju samazināšanās, ko izraisa hroniska elpceļu obstrukcija.

HOPS pašlaik ir ceturtais biežākais mirstības cēlonis Eiropā un ASV, taču tiek prognozēts, ka, smēķētāju skaitam pieaugot, 2020. gadā šī slimība būs jau trešais biežākais nāves cēlonis.

Epidemioloģiskie pētījumi liecina, ka aptuveni 60 miljoni cilvēku visā pasaulē cieš no HOPS. 10-15mlj – ASV, no kuriem gadā aptuveni 2, 75 miljoni mirst (Pauwels, 2001).

Latvijā pagaidām nav veikti pētījumi, kas ļautu precīzi spriest par HOPS izplatību, jo smēķētājiem netiek regulāri (vismaz reizi gadā) veikta spirometrija. Tomēr lielais smēķējošo cilvēku skaits, t.i., vidēji 40% (51, 1% vīriešu un 19, 2 sievietes), liecina, ka HOPS ir nopietna problēma arī Latvijā (Gilmore, 2004).

HOPS ir raksturīgs hronisks bronhīts, mazo elpceļu slimība (obstruktīvs bronhiolīts) un plaušu parenhīmas destrukcija (emfizēma), kuru relatīvā attiecība atšķiras starp HOPS slimniekiem (Saetta, 2000).

Tabakas dūmi ir nozīmīgākais HOPS riska faktors, kas izraisa strauju FEV₁ krišanos un lielāku mirstību smēķējošiem salīdzinājumā ar nesmēķējošiem HOPS slimniekiem. Atšķirība starp smēķētājiem un nesmēķētājiem pieaug tieši proporcionāli smēķēšanas daudzumam.

Mirstību no HOPS var prognozēt pēc šādiem rādītājiem: vecums, kad uzsākta smēķēšana, kopējie nosmēķētie pakgadi un pašreizējais smēķēšanas statuss. Ir konstatēts, ka HOPS attīstās tikai 10–15% smēķētāju. Tas liecina, ka ģenētiskie faktori var modificēt individuālo HOPS risku.

Tabakas dūmu izdalītie oksidanti izraisa nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) aktivāciju, un histonu deacetilāzes 2. apakštipa (HDAC2) nomākšanu, kā arī palielina iekaisuma šūnu (makrofāgu, neitrofilo leukocītu un CD8+ T - limfocītu) skaitu elpceļos. Tādējādi rodas iekaisums elpceļos un plaušu audu pārstrukturēšanās, kas ir raksturīgi HOPS (Barnes, 2003).

Pēdējos gados ir aktuāla autoimunitātes teorija HOPS patoģenēzē. Autoimunitātes hipotēzi apstiprina vairāki pētījumi, kuros pierādīta antivielu - antielastīna un antiepitēlija- veidošanās plaušu audu struktūrās (Feghali-Bostwick, 2008; Lee, 2007).

Antiepiteliālās antivielas ir vērstas pret alveolāro epitēliju un endotēliju un pastarpina no antivielām atkarīgo šūnu citotoksicitāti. Turklāt ir konstatēts, ka pelēm, kuras tika imunizētas ar ksenogēnām endoteliālajām šūnām, rodas antivielas pret šīm šūnām un attīstās emfizēma.

Šī imunizācija izraisa arī alveolocītu apoptozi un matricas metaloproteināžu aktivāciju (MMP-2 un MMP-9). Anti-endoteliālās antivielas izraisa endotēlijšūnu apoptozi *in vitro* un emfizēmas attīstību pasīvi imunizētām pelēm. Šis novērojums parāda, ka plaušu emfizēma var attīstīties imūno reakciju rezultātā (Taraseviciene-Stewart, 2005).

Ir parādīts, ka iekaisuma un autoimūnās reakcijas kontrolē T regulatorie limfocīti, kuru specifisks marķieris ir FOXP3 gēns (Tang, 2008).

2007. gadā *Lee et al.* publicēja datus par to, ka pacientiem ar emfizēmu novēro samazinātu T regulatoro šūnu daudzumu, kas korelē ar FOXP3 mRNS ekspresiju plaušu audos (Lee, 2007).

Smyth et al. parādīja, ka bronhoalveolārās lavāžas šķidrums T regulatorie limfocīti ir palielinātā skaitā gan asimptomātiskajiem smēķētājiem, gan smēķētājiem ar HOPS (Smyth, 2007).

Turpretī, *Barcelo et al.* novēroja, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem T regulatoro limfocītu skaits bronhoalveolārās lavāžas šķidrums ir palielināts, bet HOPS pacientiem - samazināts (Barcelo, 2008).

Šos pretrunīgos pētījuma datus, mūsuprāt, varētu skaidrot ar atšķirīgu Treg izplatīšanos centrālajos un perifērajos elpceļos, turklāt, iespējams, ka Treg populāciju ietekmē smēķēšanas ilgums. Līdz šim netika veikti pētījumi, kuros būtu analizēts T regulatoro šūnu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.

Turklāt, nav skaidrs, vai atšķirības starp iekaisuma procesa mehānismiem centrālajos un perifērajos elpceļos asimptomātiskajiem smēķētājiem un vidēji smagas pakāpes HOPS pacientiem

Darba hipotēze

Mūsuprāt, smēķētājiem ar normālu plaušu ventilācijas funkciju iekaisums lokalizējas pārsvarā centrālajos elpceļos un tam ir protektīva nozīme. Attīstoties HOPS, iekaisums izplatās uz perifērajiem elpceļiem un tam ir autoimūna procesa pazīmes. Būtiska nozīme šajos procesos ir intracelulārajai gēnu transkripcijai, proti, nukleārajam faktoram- κ B (NF- κ B) un histonu deacetilāzei (HDAC), kuri regulē iekaisuma citokīnu sintēzi, kā arī iegūtās imunitātes perifērajiem regulējošiem mehānismiem, kurus nosaka T regulatorās šūnas.

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. Definīcija

Hroniskai obstruktīvai plaušu slimībai (latviski HOPS, angļiski COPD) ir raksturīga progresējoša un neatgriezeniska plaušu ventilācijas funkcijas samazināšanās, ko izraisa hroniska elpceļu obstrukcija. Elpceļu obstrukciju novērtē, izmantojot spirometriju (Pauwels, 2001).

Elpceļu obstrukcijas galvenie iemesli ir hronisks bronhīts, mazo elpceļu slimība (obstruktīvs bronhiolīts) un plaušu parenhīmas destrukcija (emfizēma), kuru relatīvā attiecība variē starp HOPS slimniekiem. Iekaisuma process plaušu parenhīmā izraisa alveolu un mazo elpceļu fiksācijas zudumu, kā rezultātā samazinās plaušu elastības spēks un līdz ar to samazinās šo elpceļu spēja palikt atvērtiem izelpas laikā (Pauwels, 2001; Saetta, 2001).

Hronisku bronhītu raksturo klepus un krēpu veidošanās vismaz 3 mēnešus gadā, divus vai vairākus gadus pēc kārtas. Hroniska bronhīta gadījumā novēro gļotu hipersekreciju, sakarā ar gļotu dziedzeru hiperplāziju zemgļotādā un kausveida šūnu skaita palielināšanos bronhu epitēlijā (Pauwels, 2001; Saetta, 2001).

Emfizēma jeb gāzu apmaiņas virsmas (alveolu) destrukcija ir termins, kas apzīmē patoloģisku gaisa ceļu paplašināšanos distāli no terminālajām bronhiolām (Pauwels, 2001).

HOPS attīstība tiek iedalīta četrās smaguma stadijās, pamatojoties uz gaisa plūsmas ierobežojumu, ko mēra spirometriski kā FEV_1 (forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē), un Tifno indeksu ($FEV_1/FVC\%$, forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē/forsētā vitālā kapacitāte) [Pauwels, 2001].

HOPS iedala:

0.stadija. Riska grupa. Raksturīgs hronisks klepus un krēpu veidošanās. Plaušu ventilācijas funkcija spirometriski normāla.

1.stadija. Vieglas pakāpes HOPS. Raksturīgs viegls gaisa plūsmas ierobežojums ($FEV_1/FVC < 70\%$; $FEV_1 \geq 80\%$ no normas) un parasti, bet ne vienmēr, novērojams hronisks klepus un krēpu veidošanās.

2.stadija. Vidēji smagas pakāpes HOPS. Raksturīgs gaisa plūsmas ierobežojums ($FEV_1/FVC < 70\%$; $30\% \leq FEV_1 < 80\%$ no normas) un simptomu progresēšana- elpas trūkums, kas attīstās saasinājuma laikā ar vai bez hroniska klepus un krēpu veidošanās. 2. stadija tiek iedalīta divās apakšstadijās- IIA un IIB, pamatojoties uz faktu, ka saasinājumi ir īpaši jūtami slimniekiem, kuriem FEV_1 ir zem 50% no normas. IIA atbilst $50\% \leq FEV_1 < 80\%$ no normas un IIB atbilst $30\% \leq FEV_1 < 50\%$ no normas.

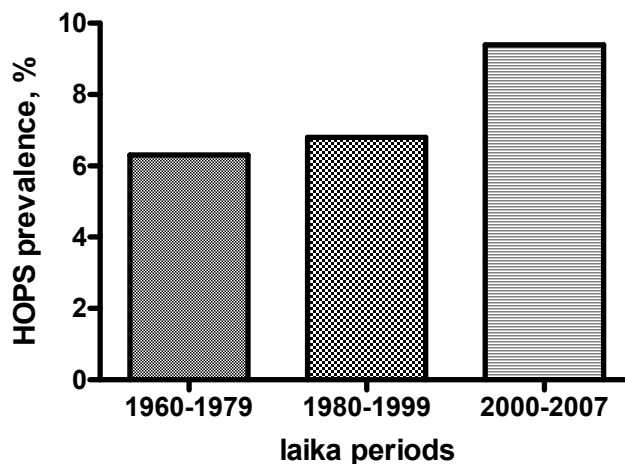
3.stadija. Smagas pakāpes HOPS. Raksturīgs smags gaisa plūsmas ierobežojums ($FEV_1/FVC < 70\%$; $FEV_1 < 30\%$ no normas), kā arī elpošanas nepietiekamība. Turklāt, var būt klīniskas norādes uz labās sirds puses nepietiekamību. Elpošanas nepietiekamību raksturo skābekļa parciālais spiediens arteriālajās asinīs (PaO_2) mazāks par 8,0KPa (60mmHg), atrodoties jūras līmenī (Pauwels, 2001).

2.2. Epidemioloģija

HOPS pašlaik ir ceturtais no biežākajiem mirstības iemesliem Eiropā un ASV, taču tiek prognozēts, ka, smēķētāju skaitam pieaugot, 2020. gadā šī slimība būs jau trešais biežākais nāves cēlonis (Anto, 2001). Turklāt, tas ir vienīgais strauji progresējošais nāves cēlonis. Epidemioloģiskie pētījumi liecina, ka aptuveni 60 miljoni cilvēku visā pasaulē cieš no HOPS, no tiem 15-20mlj ASV, un katru gadu aptuveni 2,75 miljoni mirst (Anto, 2001; Pauwels, 2001). Pētījumu dati liecina, ka laika posmā no 1960. gada līdz 2007. gadam HOPS vidējā sastopamība (prevalence) ir pieaugusi apmēram divas reizes, skat. 1. attēlu, (Viegi, 2007).

Latvijā pagaidām nav veikti pētījumi, kas ļautu precīzi spriest par HOPS izplatību, jo smēķētājiem netiek regulāri (vismaz reizi gadā) veikta spirogrāfija. Tomēr lielais smēķējošo cilvēku skaits, t.i., vidēji 40% (51,1% vīriešu un 19,2% sievietes) pēc Veselības veicināšanas centra pētījuma 2002. gada datiem, liecina, ka HOPS ir nopietna problēma arī Latvijā (Gilmore, 2004).

Epidemioloģiskie pētījumi liecina, ka ASV 4-6% baltās rases vīriešu un 1-3% sievietes FEV_1 ir mazāks par 60%, bet melnās rases pārstāvjiem atbilstoši 3,7% un 6,7% (Anto, 2001).



1. attēls. HOPS prevalence dažādos laika posmos (angl. Prevalence of COPD during last five decades), [adaptēts, no Anto, 2001].

Vidējā slimības prevalence visos vecumos ir ap 1%, taču vecumā pēc 40 gadiem jau ap 10% (Chapman, 2006). Savukārt, pēdējos pētījumos parādīts, ka hronisks bronhīts un elpceļu obstrukcija ir novērojama vidēji 7,7-16,8% cilvēku no populācijas (Celli, 2003).

Nesen *Halbert et al.* parādīja, ka spirometriski pierādīta elpceļu obstrukcija cilvēkiem vecākiem par 40 gadiem, ir sastopama 9,2% gadījumu (Halbert, 2003).

Savukārt, PVO 2006. gada pētījumos, kur tika analizētas Eiropas astoņas lielpilsētas, tika parādīts, ka hroniska bronhīta sastopamība ir 6,2% (Boutin-Forzano, 2007).

Ziemeļīrijas pētījumos, kuros tika iekļauti pieaugušie vecumā no 40 līdz 69 gadiem, hronisks bronhīts bija sastopams 14,4% gadījumu, bet HOPS bija novērojams 6,3% gadījumu (Murtagh, 2005).

Dienvidamerikas pētījums parāda, ka hroniska bronhīta prevalence Mehiko iedzīvotājiem ir 11,9%, bet Urugvajas galvaspilsētas Montevideo iedzīvotājiem sastāda 19,4% (Menezes, 2005). Savukārt, Austrijas pētījuma dati liecina, ka HOPS prevalence ir pat 26,1% pirmajā stadijā un 10,7% otrajā stadijā. Veicot pacientu aptauju, par savu slimību zināja tikai 5,6% cilvēku (Halbert, 2007).

Pēdējie pētījumi Zviedrijā liecina, ka HOPS kumulatīvā incidence ir samazinājusies no 15,3 līdz 11,8% (Lindberg, 2005). Norvēģijas deviņu gadu ilgā pētījumā ir parādīts, ka vīriešiem HOPS kumulatīvā incidence ir 8,6%, bet sievietēm - 3,6% (Johannessen, 2005).

Savukārt, Dānijā HOPS kumulatīvā incidence 25 gadu ilgā pētījumā vīriešiem bija 20,7%, bet sievietēm - 3,6% (Lokke, 2006). Somijā hroniska bronhīta un HOPS kumulatīvā incidence 30 gadu pētījumā bija 42% un 32% (Pelkonen, 2006).

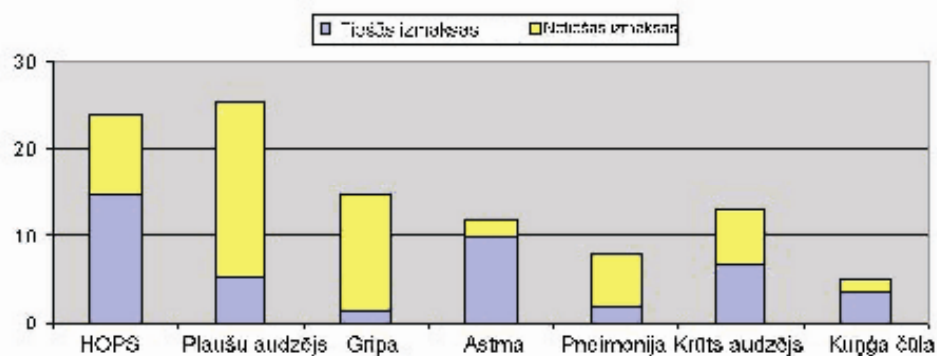
Zviedrijā HOPS prevalence, atkarībā no smaguma pakāpes, ir 8,2%-vieglās pakāpes, 5,3%-vidējās pakāpes un 0,7% smagās pakāpes HOPS (Lindberg, 2006). Savukārt, Itālijā tas ir, attiecīgi 7,3%, 4,5% un 2,2% (Zielinski, 2006).

Lielbritānijā 10% vīriešu un 11% sieviešu FEV₁ bija zem 65% (Anto, 2001). Līdzīga obstrukcijas pazīmju prevalence ir arī citās Eiropas valstīs, piemēram, Dānijā - 3,7%, Norvēģijā-4,8%, bet Spānijā - 4,8% (Anto, 2001).

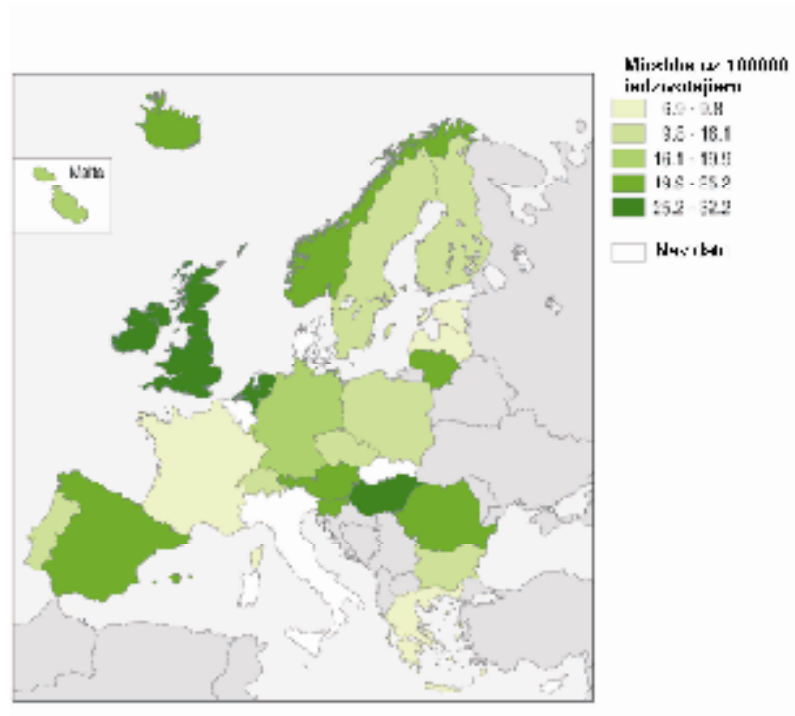
Visaugstākie mirstības rādītāji no HOPS ir Lielbritānijā, ASV, Austrumeiropā un Austrālijā, bet viszemākie - Dienvidēiropā, Skandināvijas valstīs, Izraēlā un Japānā (Anto, 2001; Mannino, 1997).

Jāņem vērā, ka HOPS būtiski ietekmē cilvēku darbaspējas, un šai slimībai ir lielas izmaksas. Piemēram, pēc Lielbritānijas datiem, gada kopējās HOPS izmaksas (ārstēšana, darbaspēju zudums, materiālās kompensācijas) bija 4,09 miljardi ASV dolāru, kas atbilst - 63 dolāri uz vienu valsts iedzīvotāju (Anto, 2001).

2.tabulā ir apkopotas HOPS izmaksas dažādās valstīs.



2. attēls. HOPS izmaksas biljonos dolāru (angl. The worldwide cost of COPD). Zilā krāsā atzīmētas tiešās izmaksas, bet dzeltenā krāsā - netiešās izmaksas biljonos dolāru (adaptēts no Anto, 2001; Pauwels, 2001).



3.attēls. Mirstība, sakarā ar HOPS, dažādās Eiropas valstīs 2003. gadā (angl. The mortality rates due to COPD in some European countries in 2003). Dati izteikti kā mirstība uz 100000 iedzīvotājiem (modificēts, no Kaiser, 2003).

Globālais HOPS epidemioloģiskais pētījums liecina, ka HOPS vidējā prevalence pasaulē vīriešiem ir 8,5-22,2%, bet sievietēm – 5,1-16,7%. Kopējā prevalence pieaugušajiem pēc 40 gadiem ir ap 9-10%.

Arī mirstības rādītāji ir samērā augsti, piemēram, Japānā tas ir 4,4 uz 100000 iedzīvotāju, bet Ķīnā tas sastāda 130 gadījumu uz 100000 iedzīvotāju (Viegi, 2007).

Ir novērots, ka HOPS attīstās 10-15% smēķētāju (Bates, 1979). Savukārt, ir parādīts, ka vecāka gadagājuma indivīdiem, kuri daudz smēķē, HOPS attīstības risks pieaug līdz pat 50-60% (Mannino, 2006). Turklāt, jāpiebilst, ka ar HOPS pārsvarā slimo vīrieši pēc 50 gadiem, lai gan pētījumos parādīts, ka ap 11,7% gadījumu HOPS novēro indivīdiem vecumā no 25 līdz 50 gadiem (Marco, 2004). Jāatzīmē, ka pēdējā desmitgadē ir novērojams saslimstības pieaugums ar HOPS arī sieviešu vidū (Cerveri, 2003).

2.3. Skrīninga programmas

Kā jau minēts, Latvijā nav HOPS skrīninga programmu, kamēr vairākās valstīs ir šādas programmas, kur pacientiem ar riska faktoriem, vecumā no 40 gadiem, reizi gadā tiek veikta spirogramma.

Piemēram, Zviedrijā, izmeklējot šādus pacientus, 27% indivīdu tika novērotas elpceļu obstrukcijas pazīmes (Stratelis, 2004).

Pēdējie pētījumi Nīderlandē liecina, ka 19% smēķētāju, vecumā no 40 līdz 65 gadiem, tika novērota elpceļu obstrukcija un noteikta vieglās pakāpes HOPS diagnoze (Van Schayck, 2002). Savukārt, Polijas pētījumu dati liecina, ka smēķētājiem, vecumā no 40 gadiem, kuriem izsmēķēto cigarešu daudzums pārsniedz 10 pakgadus, 24,3% gadījumu spiogrammā konstatē elpceļu obstrukciju (Gorecka, 2003).

2001. gadā, saskaņā ar Eiropas Respiratorās biedrības datiem, kopējās HOPS izmaksas Eiropā bija ap 38,8 biljoniem eiro, no kuriem 4,7 sastāda ambulatorā palīdzība, 2,7- medikamenti, 2,9-pacientu aprūpe slimnīcā un 28,4 biljoni eiro-darbanespējas lapu segšana (Loddenkemper, 2003).

Itālijā veiktie pētījumi parāda, ka vidējās izmaksas uz vienu HOPS pacientu ir 6365 eiro gadā (Dal Negro, 2003).

2.4. Riska faktori

HOPS riska faktori tiek iedalīti divās grupās: „endogēnajos” jeb makroorganisma faktoros un „eksogēnajos” faktoros, kuru savstarpējās mijiedarbības rezultātā attīstās šī slimība.

Viens no galvenajiem makroorganisma faktoriem ir α_1 -antitripsīna deficīts (Pauwels, 2001). Kā galvenie ārējie faktori tiek minēti: tabakas dūmi, arodputekļi un ķīmikālijas (tvaiki, kairinošas vielas, dūmi), iekštelpu un ārējais gaisa piesārņojums (Anto, 2001; Pauwels, 2001).

Makroorganisma faktori

4.3.1.a. Ģenētiskie faktori

α 1-antitripsīna nozīme HOPS patoģenēzē

Visvairāk aprakstītais riska faktors ir iedzimts α 1-antitripsīna deficīts. Tas ir 52 kilodaltonu liels plazmas glikoproteīns, kas tiek sintezēts, galvenokārt, aknās, bet to sintezē arī dažas citas šūnas, piem., alveolārie makrofāgi. *In vitro* - tas inhibē virkni proteāžu ar serīnu aktīvajā saitā, piemēram, tripsīnu, trombīnu un elastāzi.

α 1-antitripsīns (Alfa1-AT) ir akūtas fāzes proteīns un tā koncentrācija var paaugstināties divas vai trīs reizes iekaisuma laikā. Tas kavē proteolīzi akūta audu bojājuma vietās, tādējādi nomācot pārmērīgo audu bojājumu.

Inhibitors ir iekodēts 14. hromosomā, ģenam ir zināmas 75 alēles. Biežāk sastopamas ir Z, S un M alēles. Alēle M ir atrodama 90% iedzīvotāju.

Šī reti sastopamā iedzimtā recesīvā pazīme visbiežāk sastopama Ziemeļeiropas valstīs (Pauwels, 2001). Izteikts α 1-antitripsīna deficīts ir rets un bieži homozigotiem asociēts ar alēli Z. Šiem indivīdiem seruma antiproteāžu līmenis ir mazāks par 15%, un viņiem ir liels emfizēmas un aknu slimību attīstības risks.

Emfizēma galvenokārt ir panacināra un lokalizējas apakšējās daivās. Elpošanas simptomātika parādās pirms dzīves piektās dekādes un tā attīstās par 15 gadiem ātrāk smēķētājiem nekā nesmēķētājiem, savukārt, HOPS var attīstīties pat 85% pacientu (Pauwels, 2001).

Emfizēmas attīstība, antiproteāzes deficīta dēļ, ir skaidri zināma. Parastais (Z tipa) deficīts ir saistīts ar punktveida mutāciju 342. pozīcijā, kad notiek glutamīnskābes aizvietošanās uz lizīnu. Polimerizācijas rezultātā mutantais proteīns hepatocītu endoplazmatiskajā tīklā veido lielu polimēru cilpu (Rijcken, 1998).

Ne tikai mutācijas, kas ir saistītas ar α 1-AT līmeņa samazināšanos, bet arī citas mutācijas ietekmē to funkciju (Owen, 1983). Piemēram, ir pierādīts, ka pastāv saistība starp HOPS un 3' gala α 1-AT gēna mutāciju (Kalsheker, 1987; Poller, 1990). *Kalsheker et al.* parādīja, ka šī mutācija ir saistīta ar HOPS (Kalsheker, 1987).

α 1-antihimotripsīns

α 1-antihimotripsīns, tāpat kā α 1-antitripsīns, ir serīna proteāze, kas nomāc akūtās fāzes reakcijas. Alfa1-antihimotripsīns (α 1-ACT) nomāc aizkuņģa dziedzera himotripsīnu, neitrofilo leukocītu katepsīnu G, tuklo šūnu himāzi un neitrofilo leukocītu superoksīda sintēzi. To ražo arī plaušu alveolārie makrofāgi un hepatocīti (Burnett, 1984).

Alfa1-antihimotripsīna deficīts ir novērojams 1 % Šveices iedzīvotāju. Tam ir autosomālās dominantās pārmantošanas princips (Sandford, 1997). Tās deficīts nav saistīts ar noteiktām klīniskām izpausmēm, kaut gan to biežāk novēro astmas (Lindmark, 1990) un HOPS (Poller, 1992) pacientiem. *Poller et al.* aprakstīja aminoskābju aizvietošanās mehānismu *Pro227-Ala*, ko viņi novēroja HOPS pacientiem, taču to neatrada nevienam no veseliem indivīdiem. Ir novērota arī citu aminoskābju aizvietošanās, piemēram, 55. pozīcijā leicīns pret prolīnu (Poller, 1992).

Cistiskās fibrozes transmembranālais regulators

Cistiskās fibrozes transmembranālais (CFTR) gēna ekspresijas produkts veido hlora kanālus elpceļu epitēlija šūnu apikālajā galā un ir iesaistīts gļotu sekrēcijā. Šī proteīna homozigotisks deficīts vai deformācija sekmē cistiskās fibrozes attīstību, kuru raksturo paaugstināta hlorīda koncentrācija sviedros, agrīna HOPS, ko pavada sekundāras hroniskas infekcijas un bronhektāzes.

CFTR heterozigotiem indivīdiem var būt izmainīta elpceļu ūdens un elektrolītu regulācija, kā arī mukociliārais klīrens. Ir aprakstītas vairāk nekā 580 CFTR gēna variācijas, visbiežākā ir mutācija Δ F508, ko sastop 70% gadījumu (Sanford, 1997).

Vitamīna D saistītājproteīns

Vitamīnu D saistošais proteīns ir 55 kDa liels proteīns, ko ražo aknas. Tas spēj saistīt ekstracelulāro aktīnu un endotoksīnu, kā arī vitamīnu D. Vitamīnu D saistošais proteīns paaugstina komplementa 5a (C5a) hemotakses aktivitāti, kas ir ļoti būtisks faktors neitrofilo

leikocītu un makrofāgu migrācijai audos (Sanford, 1997). Papildus, vitamīnu D saistošais proteīns var sekmēt makrofāgu aktivāciju (Yamamoto, 1991).

Alfa2-makroglobulīns

Alfa2-makroglobulīns ir plaša spektra seruma proteāžu inhibitors. α 2-makroglobulīna koncentrācija ir augstāka sievietēm un pazeminās līdz ar vecumu. α 2-makroglobulīnu ražo hepatocīti, alveolārie makrofāgi un plaušu fibroblasti. Šim proteīnam piemīt aizsargājošs efekts pret elpošanas sistēmas slimībām (Sanford, 1997). HOPS pacientiem novērojama samazināta α 2-makroglobulīna koncentrācija (Brissenden, 1983).

Citohroms P4501A1

Citohroms P4501A1 ir enzīms, kas metabolizē eksogēnus komponentus, tādējādi tie tiek izvadīti urīnā vai žultī. Par šī enzīma ekspresiju atbild CYP1A1 gēns, un to mutācija ir saistīta ar plaušu vēzi.

Ir novērota saistība starp šī gēna mutāciju un HOPS, kā arī plaušu vēzi (Poller, 1989). Mutācijas molekulārais mehānisms skaidrojams ar izoleicīna aizvietošanu ar valīnu 452. pozīcijā, kas divas reizes palielina enzimatisko aktivitāti (Sanford, 1997).

Asinsgrupu antigēni

Pētījumos ir pierādīta HOPS saistība ar ABO sekretoru un Levisa gēniem (Krzyzanowski, 1986, Sanford, 1997). ABO antigēnu ekspresē visas organisma šūnas.

Arī Lewis asins grupa tiek aplūkota kā iespējams riska faktors elpceļu obstrukcijas predispozīcijai (Horne, 1985).

90% Kaukāziešu populācijas cilvēku ir *Le* dominantā alēle, kas atbild par *Lewis* substances producēšanos. Individīdiem, kuri spēj ražot antigēnu, tas tiek transformēts par *Lewis b* substanci. *Horne et al.* novēroja, ka *Lewis* negatīvajiem indivīdiem elpceļu obstrukcija sastopama biežāk (Horne, 1985).

HLA lokuss

Ir novērota dažu HLA 1. klases alēļu saistība ar HOPS. Piemēram, nozīme ir HLA-Bw16 un HLA-Bw54 (Sanford, 1997).

Superoksīda dismutāze

Superoksīda dismutāze ir glikoproteīns, kas atrodas intersticiālajā telpā, kaut gan 1% atrodas arī asins plazmā, limfā un sinoviālajā šķidrumā.

Tas ir galvenais ekstracelulārais antioksidants plaušās. Superoksīda dismutāzei piemīt augsta afinitāte pret tādiem glikozaminoglikāniem kā heparānsulfāts. Tādējādi, 98% šī enzīma atrodas saistībā ar heparānsulfātu.

Superoksīda dismutāzes gēnu polimorfisms saistīts ar arginīna aizvietošanos ar glicīnu 213. pozīcijā (Folz, 1994; Sandstrom, 1994). Apmēram 2% cilvēku no dažādām populācijām ir šī gēna heterozigoti (Sandstrom, 1994). Šīs mutācijas rezultātā, enzīma koncentrācija plazmā palielinās apmēram 30 reizes.

Pacientiem ar smagu emfizēmu, kuriem veikta plaušu transplantācija, novēro ekstracelulārās superoksīda dismutāzes koncentrācijas paaugstināšanos plazmā apmēram 10 reizes (Peno-Green, 1995).

Sekretorais leukocītu proteināzes inhibitors

Sekretorais leukocītu proteināzes inhibitors ir 12kDa liela serīna antiproteāze, kas sastopama elpošanas ceļu sekrētā. To ražo plaušu epitēlija šūnas, un tas nomāc neitrofilo leukocītu elastāzi (Sallenave, 1994). *Abe et al.* parādīja saistību starp šī gēna otrā, trešā un ceturtā eksona polimorfismu un HOPS (Abe, 1991).

Ir atklāti daudzi citi gēni, kas, iespējams, var ietekmēt indivīda risku saslimt ar HOPS. Pie tiem pieder: mikrosomu epoksīda hidrolāze, MMP (matrices metaloproteināzes), glutationa S- transferāze, katepsīns G, komplementa GcG komponents, kā arī citokīni, transkripcijas faktori un mikrosatelītu nestabilitāte (Bergelson, 1994; Cantlay, Yang, 2004; 1994; Hall, 1999; He, 2008; Rahman, 2000, Tudor, 2003; Wang, 2008).

Daudzi no šiem gēniem ir saistīti ar iekaisuma procesu un, līdz ar to iesaistīti HOPS patoģenēzē (Ishii, 1999; Lakshminarayanan, 1996).

Pētījumos ir atklāts, ka dažas granulocītu makrofāgu kolonijstimulējošā faktora (GM-CSF) alēles (1719T) ir saistītas ar neuzņēmību pret HOPS (He, 2008). Turpretim, 4.tipa kolagēna polimorfisms (alēles COL4A3-1162T) ir saistīts ar lielāku uzņēmību pret HOPS (Kim, 2008).

Nozīme ir arī TGF- β un to regulējošā gēna *smad* polimorfismam. Ir arī pierādīta korelācija starp *smad-3* gēna alēļu polimorfismu un plaušu emfizēmu (Bonniaud, 2004).

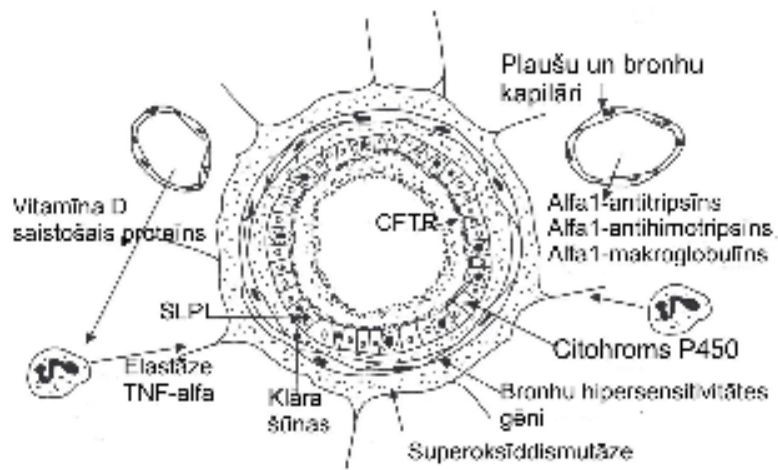
Toll līdzīgu receptoru mutācija pelēm novērš tabakas dūmu izraisītu neitrofilo leukocītu, dendrītisko šūnu un limfocītu migrāciju plaušās subakūtās, bet ne hroniskas ekspozīcijas modelī (Maes, 2006). Pelēm, kurām trūkst *Toll* līdzīgo receptoru TLR4, attīstās spontāna plaušu emfizēma, kas saistīta ar palielinātu reducētā nikotinadenīna dinukleotīda fosfāta oksidāzes-3 ekspresiju un elastīna sabrukumu. (Zhang, 2006).

Pētījumos ir parādīts, ka HOPS paasinājuma laikā ir palielināts DNS nestabilitātes sastopamības biežums inducētajās krēpās (Makris, 2008).

Ir aprakstīta dažādu novecošanās proteīnu nozīme HOPS patoģenēzē. Proteīna *Klotho knockout* pelēm, piemēram, raksturīga pastiprināta MMP-9 ekspresija un agrīni attīstās plaušu emfizēma. Savukārt, novecošanās marķieris-SMP30, kas būtībā ir antiproteāze, ko sintezē aknu šūnas, nomāc alveolu destrukciju (Sato, 2006).

Augšanas faktori	VEGF, LTBP-4
Transkripcijas faktori	STAT-3, smad3
Enzīmi	MMP-1, α_1 -antitripsīns, superoksīddismutāze
Novecošanās marķieri	SMP-30, Klotho proteīns (β galaktozidāze)
Iedzimtās imunitātes faktori	Toll līdzīgie receptori, surfaktanta proteīns D

1. Tabula. Ģenētisko faktoru nozīme HOPS patoģenēzē (angl. The role of genetic factors in COPD pathogenesis). VEGF-vaskulārais augšanas faktors, LTBP-4-latentā transformējošā augšanas faktora beta 4. saistošais proteīns, STAT-3-signaļa transdukcijas un aktivācijas transkripcijas faktors-3, smad-3-proteīnu grupa, kas regulē transformējošā augšanas faktora beta ligandus, MMP-matricas metaloproteināze, SMP-30- novecošanās proteīns-30.



4. attēls. Ģenētisko faktoru nozīme HOPS etiopatogēnē (angl. role of genetic factors in COPD), [adaptēts un modificēts no Sandfort, 1997]. Attēlā redzams, kādā veidā dažādu gēnu mutācija var sekmēt HOPS attīstību. Alfa-1 antitripsīns, alfa1-antihimotripsīns un alfa-2 makroglobulīns var nomākt proteāzes. Savukārt, šo proteīnu deficīts rada pastiprinātu elastisko šķiedru noārdīšanos. Enzīms citohroms P450, galvenokārt, atrodas Klāra šūnās, tas metabolizē toksiskās ielopotas vielas. Enzīma funkcijas traucējumi rada pastiprinātu iekaisumu plaušu audos. CFTR gēns ir saistīts ar bronhektāžu attīstību. D vitamīna saistošais proteīns ietekmē iekaisuma šūnu hemotaksi. CFTR-ir cistiskās fibrozes transmembrānālais regulators; SPLI-leikocītu sekretētais proteīnāžu inhibitors.

2.4.2. Fenotipa nozīme HOPS predispozīcijā

Lai gan lielākā daļa HOPS pacientu ir vīrieši, tomēr dažādos pētījumos ir pierādīts, ka sievietēm ir augstāks risks HOPS attīstībai. Tas saistāms ar hormonu ietekmi uz plaušām (Pauwels, 2001). *Gold et al.* savā pētījumā parādījis, ka smēķējošām jaunām sievietēm ir izteiktāka FEV₁ samazināšanās, salīdzinājumā ar smēķējošiem jauniem vīriešiem (Gold, 1996). *Prescott et al.* longitudinālajā pētījumā konstatēja, ka Dānijas sievietēm ir lielāks hospitalizācijas risks, sakarā ar HOPS, kas korelē ar izsmēķētajiem pakgadiem (Prescott,

1997). Līdzīgi rezultāti tika novēroti arī citā pētījumā (Silverman, 2000). *Paoletti et al.* atzīmē, ka sievietēm ir lielāka elpceļu hiperreaktivitāte, kas izskaidro straujāku FEV₁ samazināšanos (Paoletti, 1995).

2.4.3. Elpceļu hiperreaktivitāte

Astma un elpceļu hiperreaktivitāte, ko uzskata par HOPS riska faktoru, ir saistīta gan ar ģenētiskajiem, gan apkārtējās vides faktoriem (Paoletti, 1995). Astmātiķiem ir novērota nedaudz paaugstināta plaušu funkcijas lejupslīde salīdzinājumā ar neastmātiķiem.

Smēķētājiem ar elpceļu hiperreaktivitāti novērota straujāka plaušu funkcijas lejupslīde salīdzinājumā ar smēķētājiem, kuriem nav elpceļu hiperreaktivitātes (Anto, 2001; Rijcken, 1998).

Kā šī tendence ir saistīta ar HOPS nav zināms, jo elpceļu hiperreaktivitāte var attīstīties arī pēc tabakas dūmu vai citu apkārtējās vides kaitīgu vielu iedarbības un var būt citu elpceļu slimību rezultāts (Hospers, 2000).

2.4.4. Plaušu augšana

Plaušu augšana ir saistīta ar procesiem, kas notiek grūtniecības laikā, dzimšanas svaru un apkārtējās vides ietekmi bērnībā (Anto, 2001). Nepietiekama plaušu ventilācijas funkcija (mērīta spirometriski) norāda uz HOPS attīstības risku. Svarīgi, ka smēķēšana grūtniecības laikā var ietekmēt augļa plaušu attīstību, kā arī izraisīt pārmaiņas tā imūnsistēmā (Pauwels, 2001).

2.4.5. Plaušu novecošanās

Eksperimentos ar dzīvniekiem ir pierādīts, ka, plaušām novecojot, tajās pastiprināti tiek fragmentētas elastiskās šķiedras, kas, savukārt, var aktivizēt neitrofilos leukocītus, kas var radīt plaušu alveolocītu apoptozi (Funada, 2004).

Novecošanās proteīna *Klotho* negatīvām pelēm raksturīga pastiprināta MMP-9 ekspresija un agrīni attīstās plaušu emfizēma.

Novecošanās marķieris-SMP30 būtībā ir antiproteāze, ko ražo aknu šūnas, nomāc alveolu destrukciju (Sato, 2006).

Ārējie faktori

No daudzām ieelpotajām vielām, ar ko cilvēks var sastapties dzīves laikā, galvenokārt, tabakas dūmi, arodputekļi un ķīmikālijas var būt HOPS cēlonis.

2.4.6. Tabakas dūmi

Tabakas dūmi ir nozīmīgākais HOPS riska faktors, kas izraisa strauju FEV₁ lejupslīdi un lielāku mirstību smēķējošiem, salīdzinājumā ar nesmēķējošiem HOPS slimniekiem (Anto, 2001; Rijcken, 1998). Atšķirība starp smēķētājiem un nesmēķētājiem pieaug tieši proporcionāli smēķēšanas daudzumam (Pauwels, 2001). Smēķēšanas uzsākšanas vecums, kopējie nosmēķētie pakgadi un pašreizējais smēķēšanas statuss ir prognozes rādītāji mirstībai no HOPS.

HOPS attīstās tikai 10-20% smēķētāju, kas liecina par to, ka ģenētiskie faktori var modificēt individuālo HOPS risku (Barnes, 1999; Anto, 2001). Pasīvā smēķēšana, tabakas dūmu klātbūtne gaisā, arī var veicināt HOPS attīstību, palielinot kopējo ieelpoto daļiņu un gāzu slodzi plaušām (Anto, 2001).

2.4.7. Arodputekļi un ķīmikālijas

Arodputekļi un ķīmikālijas (tvaiki, kairinošas vielas un dūmi) var būt par cēloni HOPS attīstībai- īpaši, ja to iedarbība ir ilgstoša un intensīva, piemēram, ogļračiem (Pauwels, 2001). Šīs vielas sekmē elpceļu reaktivitātes pieaugumu, īpaši tajos elpceļos, kuri jau bijuši saskarsmē ar tabakas dūmiem vai citām vielām (Anto, 2001).

Churg et al. eksperimentos ar žurkām ir novērojis, ka azbests izraisa pastiprinātu NF-κBp65 ekspresiju alveolārajos makrofāgos, kolagēna un transformējošā augšanas faktora sintēzi, tādējādi sekmējot plaušu fibrozi (Chung, 2002).

2.4.8. Ārējais un iekštelpu gaisa piesārņojums

Ārējā gaisa piesārņojuma nozīme HOPS attīstībā ir neskaidra, bet tā ir neliela, salīdzinājumā ar smēķēšanu. Kā riska faktors HOPS attīstībai tiek minēts iekštelpu gaisa piesārņojums, kas veidojas, lietojot biomasas kurināmo, cepot un kurinot uguni slikti ventilētās telpās. Rezultātā veidojas daudz dispersu daļiņu iekštelpu gaisā (Anto, 2001; Rijcken, 1998).

Zemp et al. savā pētījumā konstatēja lielāku hroniska bronhīta prevalenci cilvēkiem, kuri dzīvo apvidos ar augstu gaisa piesārņojumu (Zemp, 1999).

Šveicē veiktajā pētījumā tika pierādīts, ka gaisa piesārņojums ar NO₂ saistāms ar FEV₁ samazināšanos (Ackermann-Liebrich, 1997). Par līdzīgiem rezultātiem ziņo arī ASV pētnieki (Peters, 1999).

2.4.9. Infekcijas

Uzskata, ka pārceļotās smagās infekcijas bērnībā samazina plaušu funkciju un pastiprina HOPS simptomus pieaugušajiem. Tas ir izskaidrojams ar to, ka infekcijas bērnībā var paaugstināt elpceļu reaktivitāti, kas ir HOPS riska faktors (Pauwels, 2001).

Vīrusu infekcijas var samazināt jaundzimušā svaru, kas arī ir HOPS riska faktors (Anto, 2001; Rijckn, 1998).

Ir pierādīts, ka gan baktērijas, gan vīrusi, piemēram, *Haemophilus influenzae*, adenovīruss un respiratori sincitiālais vīruss aktivē NF-κB sintēzi epitēlija šūnās un makrofāgos, tādējādi izraisot iekaisumu plaušās (Pauwels, 2001; Wang, 2003).

2.4.10. Sociālais stāvoklis un barojums

Epidemioloģiskajos pētījumos parādīts, ka HOPS risks inversi korelē ar sociālo statusu (Prescott, 1999). *Menezes et al.*, veicot pētījumu Brazīlijā, konstatēja, ka zema izglītība, nepietiekama pārtika un nelabvēlīga ģimene saistāmi ar lielāku risku saslimt ar hronisku bronhītu (Menezes, 1994).

Jāatzīmē, ka dažām pārtikas piedevām piemīt protektīva nozīme. Tie ir dažādi vitamīni, piem., vitamīns E un C, kuriem piemīt antioksidatīvās īpašības (Anto, 2001).

Ir veikti pētījumi, kuros ziņots, ka polinepiesātināto taukskābju lietošana uzturā var kavēt HOPS attīstību smēķētājiem (Shahar, 1994).

2.5. HOPS patoģenēze

HOPS patoģenēze shemātiski redzama 5. attēlā. Šūnu līmenī HOPS raksturo virkne bioloģisku procesu. Asimptomātiskajiem smēķētājiem rodas iekaisums elpceļos, taču HOPS pacientiem tas ir izteiktāks, to parasti pavada arī sistēmiskās izmaiņas organismā- sirds, asinsvadu un muskuļaudu bojājumi.

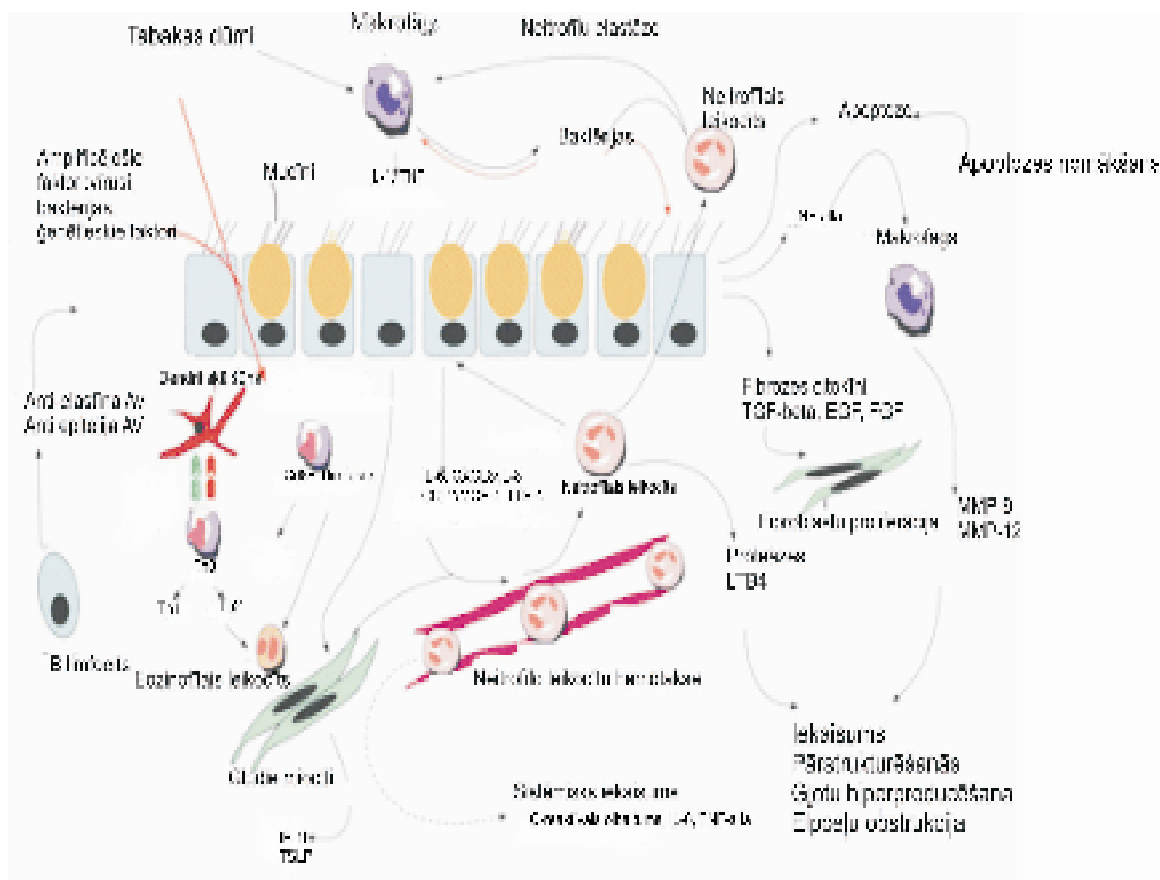
HOPS ir raksturīgs hronisks elpceļu, plaušu parenhīmas un plaušu asinsvadu iekaisums. Elpceļos novēro iekaisuma šūnu infiltrāciju, fibrozi un muskuļslāņa sabiezējumu. Savukārt, raksturīgākās pārmaiņas plaušu artērijās ir endotēlija disfunkcija, asinsvadu iekšējās sienas sabiezējums un iekaisuma izraisītās pārmaiņas adventīcijā (Saetta, 2001).

Ieelpotās kaitīgās daļiņas un gāzes, kas sekmē HOPS attīstību, ir cēlonis plaušu iekaisuma attīstībai, kas, savukārt, izraisa audu bojājumu, vājina aizsargsistēmu un izmaina atjaunošanās mehānismus (Barnes, 1997; Rahman, 2000).

HOPS patoģenēzē vēl ir iesaistīti tādi procesi kā proteāžu-antiproteāžu un oksidantu/antioksidantu disbalanss plaušās (Bergelson, 1994; Beutler, 1999).

Šie procesi var būt iekaisuma sekas, vai tos var izraisīt vides faktori, piemēram, tabakas dūmu oksidanti (Rahman, 2000).

Tagad secīgi apskatīsim HOPS patoģenēzi.



5. attēls. HOPS patoģenēzē iesaistītie mehānismi (angl. The mechanisms implicated in COPD pathogenesis); adaptēts un pilnveidots no Chung, 2008.

Tabakas dūmu ietekmē aktivizējas neitrofilie leikocīti, makrofāgi, epitēlija šūnas, dendrītiskās šūnas, fibroblasti, T un B limfocīti, kā arī gludie miocīti, kas ražo virkni citokīnu, hemokīnu un proteāžu.

Amplificējošie faktori (vīrusi, oksidatīvais stress, ģenētiskie faktori) pastiprina iekaisuma atbildes. Av-antivielas, Th-T helpera šūna, MHC-galvenais histosaderības komplekss, TCR-T šūnu receptors, CXCL-CXC hemokīna ligands, IP-Interferona γ inducējošs proteīns, RANTES- IL-8 grupas citokīns, saistīts ar T šūnu aktivāciju, tajās ekspressēts un sekretēts; TSLP-tūmasa stromas limfopoetīns, TNF-tumora nekrozes faktors, MCP-monocītu hemotakses proteīns, LT-leikotriēns, TGF-transformējošais augšanas faktors, EGF-epidermas augšanas faktors, MMP-matrices metaloproteināzes.

2.5.1. Bronhiālā epitēlija nozīme HOPS patoģenēzē

Dažādi ārējie faktori (piemēram, tabakas dūmi) primāri iedarbojas uz bronhu epitēlija šūnām. Epitēlija kairinājums var izraisīt tā metaplāziju daudzkārtainajā plakanajā epitēlijā ar sekojošu mukociliārā klīrensa pasliktināšanos, un tas var būt plakanšūnu karcinomas iemesls.

Kā liecina bronhu biopsiju materiāla pētījumi, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem *in vitro* pēc iedarbības ar tabakas dūmiem bronhu epitēlija caurlaidība palielinās visās pētītajās grupās, bet vislielāko efektu novēro HOPS pacientu materiālā.

Turpretī, mazākas pārmaiņas ir smēķētājiem ar normālu plaušu ventilācijas funkciju (Lakshminarayanan, 1996; Li, 1994; Morrison, 1999; Pietarinen, 1998;).

Epitēlija caurlaidības palielināšanās ir saistāma, galvenokārt, ar neselektīvo jonu kanālu *TRPC* (angl.-transient receptor potential channel), un *TRPV₁* (angl.-transient receptor potential vanilloid channel) caurlaidības palielināšanos (Groneberg, 2004; Reilly, 2003; Sweeney, 2002).

Bronhu epitēlijam ir svarīga nozīme elpceļu antioksidatīvās aizsardzības nodrošināšanā. Tabakas dūmiem iedarbojoties *in vitro* uz bronhu epitēliju, intracelulārā glutationa līmenis būtiski pazeminās, bet vislielākais tā līmeņa kritums tika novērots paraugos no HOPS slimniekiem (Cho, 1999; Liu, 1996; Rahman, 2000), kas liecina par iespējamu nepietiekamu antioksidatīvās aizsardzības sistēmu HOPS pacientiem.

Elpceļu epitēlijšūnas arī pašas var izdalīt oksidantus (Dummount, 1999; Mulier, 1998). Reaģējot uz eksogēniem kairinājumiem, epitēlija šūnas ražo vairākus iekaisuma mediatorus (Rahman, 2000; Ward, 1996). No tiem jāmin: GM-CSF (granulocītu makrofāgu koloniju-stimulējošais faktors), MIP-1 α (makrofāgu iekaisuma proteīns-1 α), IL-1 β u.c.

Pētījumos *in vitro* novērots, ka aktivētas bronhu epitēlijšūnas būtiski palielina IL-8 mRNS ekspresiju un IL-8 sintēzi, kas ir spēcīgs hemotakses un aktivācijas faktors neitrofilajiem un eozinofilajiem leukocītiem (Lakshminarayanan, 1996).

IL-8 sintezē ne tikai bronhu epitēlija šūnas, bet arī aktivēti makrofāgi un neitrofilie leukocīti (Barnes, 1998; Caramori, 2003). IL-8 sintēzi bronhu epitēlijšūnās un makrofāgos stimulē TNF- α , kas, aktivējot transkripcijas faktoru NF- κ B (nukleārais faktors- κ B), sekmē iekaisuma mediatoru sintēzi (Barnes, 2003).

Kā galvenie TNF- α avoti var būt makrofāgi un neitrofilie leukocīti (Rahman, 2000).

Elpceļu epitēlijam ir svarīga nozīme elpceļu pārstrukturēšanās procesā HOPS slimniekiem, jo tas izdala vairākus augšanas faktorus (IL-1, IL-8, TGF- β un EGF). Būtiski palielināta EGF (epidermālais augšanas faktors) sintēze tika novērota HOPS slimnieku bronhu epitēlijšūnās, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem (Lavigne, 2004; Chung, 2001).

Pētījumos ir novērota ticama korelācija starp TGF- β (transformējošais augšanas faktors- β) ekspresējošām bronhu epitēlijšūnām un bazālās membrānas biezumu, un fibroblastu skaitu HOPS slimniekiem (Celedon, 2004). Būtiska korelācija HOPS pacientiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem tika novērota starp TGF- β pozitīvajām šūnām un FEV₁% (Chung, 2001; Wu, 2004).

Ir konstatēta palielināta hemokīnu un to receptoru ekspresija epitēlija šūnās HOPS pacientiem, salīdzinot ar asimptomātiskajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (Masubuchi, 1998). Līdzīgi HOPS pacientiem epitēlija šūnās ir novērota palielināta EGFR (epitēlija augšanas faktora receptora ekspresija), kas nesamazinās, pārtraucot smēķēšanu (O'Donnell, 2004; Kurie, 1996). Jāatzīmē, ka pastiprināta EGFR ekspresija ir agrīns rādītājs, kas smēķētājiem korelē ar plaušu audzēja attīstības risku (Franklin, 2002).

Pētījumi parāda, ka HOPS pacientiem perifēro elpceļu epitēlijšūnās ir palielināta proapoptostiskā gēna purīna, antioksidantu, piemēram, glutationa peroksidāzes un ubikvitīna karboksiterminālhidrolāzes ekspresija. Turpretim, tai pašā laikā novērota samazināta IL-4 receptora un hemokīna liganda ekspresija (Harvey, 2007).

Līdzīgi novērota arī citu gēnu ekspresijas palielināšanos, kura tomēr mazinās, smēķēšanu pārtraucot. Šeit jāmin hemokīna receptora gēns, S-100 kalciju saistošais proteīns un kalciju saistošais tirozīna fosforilāzes regulētājproteīns (Chari, 2007).

Proteomikas pētījumi liecina, ka palielināta šaperonu, glikozes regulētājproteīna-78, kalretikulīna, kā arī virknes citu enzīmu ekspresija ir iesaistīta antioksidantu aizsardzībā (Kelsen, 2008).

HOPS pacientiem ir raksturīgs arī palielināts kausveida dziedzeršūnu skaits gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos, kas korelē ar HOPS smagumu (Araya, 2007).

Turklāt, pētījumi liecina, ka epitēlija šūnās palielinās proliferatīvie procesi, pieaug galektīna ekspresija, kas ir svarīgi epitēlija proliferācijā un apoptozē (Pilette, 2007).

Kā redzams, epitēlijšūnām ir svarīga nozīme fibroblastu aktivācijā un proliferācijas veicināšanā, izdalot tādus augšanas faktorus kā IL-8, TGF- β un citus mediatorus, kas sekmē

makrofāgu, neitrofilo un eozinofilo leikocītu piesaistīšanu un aktivāciju elpceļos, tā veicinot iekaisuma procesu, fibrozi un plaušu audu pārstrukturēšanos.

2.5.2. Kausveida dziedzeršūnas, zemgļotādas dziedzeri un gļotu izdalīšanās

Kausveida dziedzeršūnu hiperplāzija ir izteiktāka HOPS pacientiem, salīdzinot ar asimptomātiskajiem smēķētājiem (Innes, 2006). Lai gan agrākie pētījumi parāda, ka gļotu pārproducēšanai nav prognostiskas nozīmes (Peto, 1983), tomēr jaunākie pētījumu dati liecina, ka hroniska krēpu pārproducēšana ir saistīta ar hospitalizācijas risku, FEV₁ lejupslīdi un HOPS attīstību (de Marco, 2007).

Autopsiju dati liecina, ka pacientiem, kas mira no HOPS, plaušās konstatē palielinātu intralumenālu gļotu daudzumu (Aikawa, 1989). Turklāt, perifērajos elpceļos HOPS pacientiem tika novērota palielināta mucīna uzkrāšanās (Hogg, 2004).

Asimptomātiskajiem smēķētājiem, bet izteiktāk - HOPS pacientiem centrālajos elpceļos novēroja zemgļotādas dziedzeru hipertrofiju un hiperplāziju (Reid, 1954, Dunnill, 1969).

HOPS pacientiem kausveida dziedzeršūnu hiperplāzija ir novērojama gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos.

HOPS pacientiem ir palielināta MUC5B un MUC5AC ekspresija perifēro elpceļu lūmenā (Saetta, 2000), un MUC5AC ekspresija epitēlijšūnās (Caramori, 2004).

Turklāt, centrālajos elpceļos HOPS pacientiem ir novērota palielināta MUC5AC, bet samazināta MUC5B ekspresija (Innes, 2006). Kausveida dziedzeršūnu hiperplāzija ir cieši saistīta ar palielinātu neitrofilo leikocītu skaitu, jo tie, atbrīvojot elastāzi un katepsīnu G, rada dziedzeršūnu degranulāciju (Sommershoff, 1990).

Tabakas dūmos esošie oksidanti var aktivēt EGFR, kas veicina kausveida glandulocītu hiperplāziju (Shim, 2001; Takeyama, 2000)

Pēdējos gados MUC glikoproteīnu regulācija tika intensīvi pētīta. MUC gēnu ekspresiju regulē iekaisuma citokīni un vairāki mikroorganismi. Citokīnu un gramnegatīvo baktēriju lipopolisaharīdi aktivē MAPK kināžu signālmehānismu, kas var aktivēt NF-κB un/vai aktivētājproteīnu-1. Tie, savukārt, regulē MUC2 un MUC5AC ekspresiju elpceļos (Rose, 2006).

2.5.3. Neitrofilo leukocītu nozīme HOPS patoģenēzē

Neitrofilie leukocīti elpceļos parasti atrodas zemepitēlijā, tuvu zemgļotādas dziedzeriem un gludajai muskulatūrai (Baraldo, 2004). HOPS pacientu inducētajās krēpās un bronhoalveolārās lavāžas materiālā (BAL) ir novērots būtiski paaugstināts neitrofilo leukocītu relatīvais un absolūtais skaits, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem (Rutgers, 2000; Jurka, 2001; Lacoste, 1993; Thompson, 1989).

Arī asimptomātiskajiem smēķētājiem ir novērots būtiski paaugstināts neitrofilo leukocītu absolūtais un relatīvais skaits inducētajās krēpās (Jurka, 2001) un BAL šķidrumā (Thompson, 1989), salīdzinājumā ar nesmēķētājiem, bet šī starpība ir mazāka.

Pētījumu dati par neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos elpceļos visai pretrunīgi: vieni autori nenovēro būtiskas izmaiņas neitrofilo leukocītu skaitā bronhu gļotādā HOPS pacientiem, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem (Di Stefano, 1996; Lacoste, 1993; Lams, 2000; Saetta, 1994), turpretim, citi novēro palielinātu neitrofilo leukocītu skaitu HOPS slimnieku bronhu epitēlijā un subepitēliālajā slānī (Pesci, 1998).

Dažos pētījumos ir novērota būtiska inversa korelācija starp FEV₁ un neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos elpceļos (Lams, 2001). Savukārt, HOPS pacientiem perifērajos elpceļos un plaušu parenhīmā, galvenokārt, netika atrasta korelācija starp neitrofilo leukocītu infiltrāciju un FEV₁ (Saetta, 1998; Saetta, 1999).

Neitrofilo leukocītu aktivācijai un piesaistīšanai elpceļos nozīme ir tādām hemotaksīnam kā IL-8, ko izdala aktivēti makrofāgi, neitrofilie leukocīti un bronhu epitēlijšūnas (Nishikawa, 1999; Rahman, 2000).

Svarīgs neitrofilo leukocītu hemotakses faktors ir pastiprināta E selektīna ekspresija endoteliālajās šūnās (Di Stefano, 1994). Neitrofilo leukocītu hemotakses faktori ir IL-8 un LTB₄.

Tabakas dūmi aktivē alveolāros makrofāgus, kā rezultātā tie producē GM-CSF un G-CSF, kas sekmē neitrofilo leukocītu veidošanos kaulu smadzenēs (Terashima, 1997).

Ir novērots, ka HOPS pacientiem IL-8 koncentrācija inducētajās krēpās ticami inversi korelē ar FEV₁/FVC% (Rutgers, 2000). HOPS pacientu krēpās un asinīs cirkulējošajos neitrofilajos leukocītos ir palielināta leukocītu specifisko integrīnu CD11b/CD18 ekspresija (Yamagata,

2007), bet asinīs neitrofilajiem leukocītiem piemīt samazināta hemotakse un migrācija pret N-formil-metionil-leicil-fenilalanīnu un IL-8 (Yoshikawa, 2007).

Tabakas dūmos esošie ekstrakti nomāc neitrofilo leukocītu fagocitārās īpašības, samazinot tajos kaspāzes-3 aktivitāti, kā rezultātā netiek kavēta spontānā apoptoze (Stringer, 2007).

Neitrofilie leukocīti sekretē serīna proteāzes, tajā skaitā, katepsīnu G, neitrofilo leukocītu elastāzi, proteināzi-3, kā arī MMP-8 un MMP-9. Neitrofilo leukocītu elastāze ir svarīgs elastīnu šķeļošs proteolītiskais enzīms, kas bojā plaušu elastisko karkasu.

Pētījumos *in vitro* novērots, ka neitrofilo leukocītu proteāzes-elastāze, kolagēnāze, neitrofilo leukocītu katepsīns-G izraisa spēcīgu epitēlija atslāņošanu no bronhu bazālās membrānas (Keatings, 1997). Neitrofilie leukocīti spēj izdalīt skābekļa brīvos radikāļus. Neitrofilo leukocītu mieloperoksidāze katalizē ūdeņraža peroksīda (H_2O_2) reakciju ar Cl^- (hlora jonu). Tā rezultātā veidojas HOCl (hipohlorskābe), kas ir ļoti spēcīgs oksidants (Rahman, 2000).

HOPS paasinājuma laikā palielinās skābekļa brīvo radikāļu izdalīšanās no neitrofilajiem leukocītiem (Rahman, 1996). Tika novērots, ka arī pasīvā smēķēšana būtiski palielina neitrofilo leukocītu skaitu plaušās, hemotakses aktivitāti un oksidantu izdalīšanos (Rahman, 2000).

Pētījumos *in vitro* novērots, ka tabakas dūmos esošo skābekļa radikāļu ietekmē, samazinās neitrofilo leukocītu spēja deformēties, kā arī palielinās brīvo radikāļu izdalīšanās no pašiem neitrofilajiem leukocītiem, kas, iespējams, ir viens no iemesliem, kāpēc šīs šūnas uzkrājas smēķētāju elpceļos (Drost, 1992).

2.5.4. Eozinofilo leukocītu nozīme HOPS patoģenēzē

Citokīnu iedarbības rezultātā, bronhu gļotādu infiltrē aktivēti eozinofilie leukocīti, $CD4^+$ T limfocīti un tuklās šūnas, kas ir raksturīgs vēlīnai alerģiskajai reakcijai.

GM-CSF, IL-3 un IL-5 veicina eozinofilo leukocītu proliferāciju un nobriešanu kaulu smadzenēs.

Savukārt, eozinofilo leukocītu migrāciju no asinsvadiem nosaka tādi hemotakses faktori kā eotaksīns un RANTES (IL-8 grupas citokīns).

Adhēzijas molekulas uz endotēlija virsmas (intercelulārā adhēzijas molekula – ICAM-I, vaskulārās adhēzijas molekula – VCAM-I) un šūnu virsmas receptori (LFA-1, VLA-1),

veicina šūnu pieķeršanos endotēlijam un migrāciju cauri asinsvadu sienām uz iekaisuma perēkli. Par adhēzijas molekulu nozīmi liecina fakts, ka ģenētiski modificētām ICAM-1 negatīvām pelēm pēc provokācijas ar alergēnu eozinofilo leukocītu infiltrācija, T-limfocītu aktivācija un bronhu hiperreaktivitāte ir ievērojami mazāka nekā parastām pelēm (Chung, 2008).

Aktivējoties eozinofilajiem leukocītiem, tie izdala virkni citokīnu, mediatoru (PGE₂, PGI₂, LTC₄ un PAF) un toksisko olbaltumu (eozinofilo leukocītu katjoniskais proteīns-ECP, galvenais bāziskais proteīns - MBP, eozinofilo leukocītu neirotoksīns – EDN), kam ir svarīga nozīme bronhiālās astmas patoģenēzē (Pizzichini, 1998).

Prostaglandīni un leukotriēni nosaka bronhu gludās muskulatūras spazmu un gļotu hipersekrēciju. Turpretī, ECP atspoguļo eozinofilo leukocītu aktivācijas pakāpi un tiek izmantots to aktivitātes novērtēšanai zinātniskajos pētījumos.

Palielināts eozinofilo leukocītu skaits HOPS pacientiem tika novērots krēpās, BAL šķidrumā un elpceļu sienā (Lacoste, 1993; Fujimoto, 1999; Linden, 1993).

Eozinofilo leukocītu nozīme HOPS patoģenēzē vēl pilnībā nav skaidra, taču palielināts to skaits krēpās un BAL šķidrumā ir saistīts ar labāku prognozi un labāku glikokortikoīdu terapijas efektu (Pizzichini, 1998).

Nesen parādīts, ka par HOPS paasinājumu liecina samazināts eozinofilo leukocītu skaits elpceļu sienā, bet palielināts to skaits BAL šķidrumā (Snoek-Stroband, 2008).

2.5.5. Makrofāgu nozīme HOPS patoģenēzē

Makrofāgiem ir svarīga nozīme HOPS patoģenēzē. Tie spēj izdalīt skābekļa brīvos radikāļus un lipīdu mediatorus.

Vairākos pētījumos ir iegūti pretrunīgi dati, attiecībā uz makrofāgu infiltrāciju centrālajos elpceļos.

Dažos pētījumos netika novērota būtiska atšķirība starp makrofāgu infiltrāciju centrālajos elpceļos asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem (Lams, 2000), savukārt, citos tiek ziņots par paaugstinātu makrofāgu skaitu centrālajos elpceļos HOPS pacientiem, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem (Di Stefano, 1996; Saetta, 1993).

Turpretī, plaušu rezekcijas materiāla pētījumos ir novērots, ka HOPS pacientu perifērajos elpceļos nav būtiskas atšķirības makrofāgu skaitā, salīdzinājumā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem (Saetta, 1998).

Smēķētājiem palielināts makrofāgu skaits perifērajos elpceļos saistīts ar peribronhiolāru fibrozi un izsmēķētājiem pakgadiem (Fraig, 2002).

Ar tabakas dūmiem aktivēti alveolārie makrofāgi izdala vairākus neitrofilo leukocītu hemotakses faktorus, piemēram, IL-8, LTB-4. Kā norāda *Nishikawa et al.* tas, iespējams, ir no tabakas dūmos esošā superoksīda atkarīgs process, kas ar NF- κ B aktivācijas starpniecību izraisa IL-8 ekspresiju makrofāgos (Nishikawa, 2001).

Palielināts makrofāgu skaits ir saistīts ar palielinātu monocītu piesaistīšanos plaušu audiem hemotakses faktoru ietekmē. Starp tiem svarīga nozīme ir MCP-1 (monocītu hemotakses faktors) un CXC hemokīniem (Barnes, 2003).

Pētījumos novērots, ka ar tabakas dūmiem aktivēti makrofāgi būtiski palielina IL-1 β , IL-6, IL-8 un TNF α izdalīšanos, tādējādi veicinot iekaisuma procesu attīstību plaušās (Barnes, 1997; Rahman, 2000).

Aktivēti makrofāgi spēj izdalīt vairākus oksidantus, piemēram, makrofāgos no brīvajiem skābekļa radikāļiem dzelzs sāļu klātbūtnē veidojas hidroksila radikālis (OH \cdot).

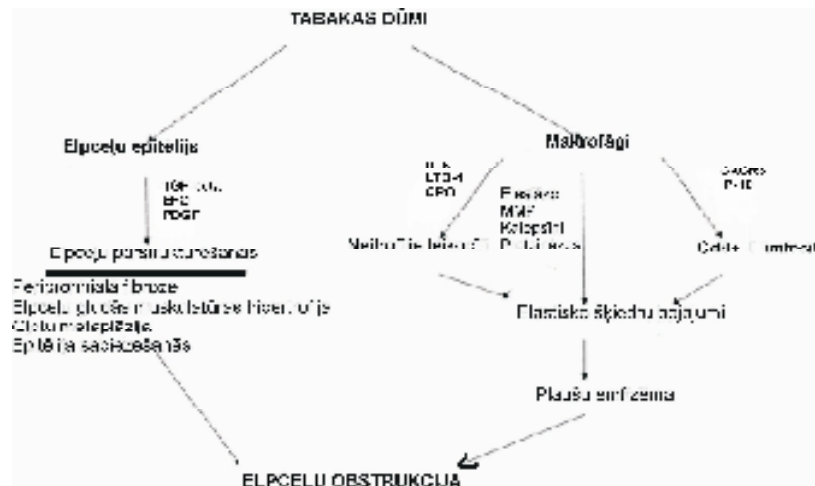
Šīm šūnām ir būtiska nozīme plaušu emfīzēmas un fibrozes attīstībā.

Makrofāgi pastiprināti izdala arī virkni citu iekaisuma mediatoru, piemēram, IP-10 (interferona γ indukcijas proteīns), GRO- α (augšanas faktoram līdzīgais onkogēns α), monokīnu inducētais interferons γ (Mig) un interferonu inducētais T šūnu hemotakses faktors (I-TAC).

No asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem iegūtie alveolārie makrofāgi aktīvi izdala matrices metaloproteināzes, MMP, īpaši MMP-9 un MMP-1.

Smēķētājiem notiek aktīva makrofāgu proliferācija, jo tajos ir palielināta antiapoptotiskā proteīna bcl-x un šūnas cikla inhibētājproteīna ciklīna atkarīgās kināzes p21 ekspresija (Tomita, 2002). To apstiprina arī palielināta Ki-67 ekspresija makrofāgos (Hodge, 2007). Turklāt, pētījumi pierāda, ka makrofāgiem, kuri ir iegūti no HOPS pacientiem, ir samazinātas fagocitārās spējas (Hodge, 2003).

Makrofāgu metaloproteināzes sagrauj plaušu audu elastisko karkasu, tādējādi veicinot emfizēmas attīstību, savukārt, izdalot tādus iekaisuma mediatorus kā TGF-β un PAF (trombocītu aktivētājfaktors), veicina plaušu fibrozi (Saetta, 2001).



6. attēls. Makrofāgu un elpceļu epitēlija šūnu nozīme HOPS patoģenēzē (angl. Macrophages and airways epithelial cells in COPD pathogenesis). Tabakas dūmu ietekmē aktivējas makrofāgi un elpceļu epitēlija šūnas, kas ražo virkni hemokīnu, citokīnu un adhēzijas molekulas. TGF-transformējošais augšanas faktors, EGF-epidermas augšanas faktors, PDGF-trombocītu augšanas faktors, IL-interlekīns, CRO-C reaktīvais olbaltums, LTB4-leikotriēns B4, IP-Interferona γ inducējošs proteīns.

Pētījumi liecina, ka makrofāgi, kas tika izolēti no HOPS pacientiem, ir nejutīgi pret kortikosteroīdiem, kas ir skaidrojams ar nomāktu HDAC2 sintēzi tajos (Di Stefano, 2002). Teofelīnam un flavonoīdam resveratrolam piemīt spēja atjaunot HDAC2 aktivitāti makrofāgos (Donnelly, 2003).

2.5.6. CD8 limfocītu nozīme HOPS patoģenēzē

Bronhu biopsijas un plaušu rezekcijas materiālā HOPS pacientiem ir būtiski palielināts CD8 limfocītu skaits, salīdzinājumā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem, turpretī CD4 limfocītu skaits būtiski neatšķiras abām pētītajām grupām (Di Stefano, 1996; Lams, 2001; Turato, 2002).

Turklāt, ir novērota ticama negatīva korelācija starp CD8 limfocītu skaitu un FEV₁% gan smēķētājiem ar hronisku bronhītu, gan HOPS pacientiem (Lams, 2001; O'Shaughnessy, 1997).

Smēķētājiem ar hronisku bronhītu, salīdzinājumā ar veseliem nesmēķētājiem, bronhu sienā ir novērots palielināts aktivēto CD25 vai IL-2 receptoru pozitīvu T limfocītu skaits.

Plaušu artēriju sienā ir novērota būtiski paaugstināta CD8 limfocītu infiltrācija gan vieglas pakāpes HOPS pacientiem, gan smēķētājiem bez elpceļu obstrukcijas, kas norāda uz CD8 limfocītu iesaistīšanos iekaisuma procesā plaušās jau agrīnā HOPS stadijā (Saetta, 1999).

T limfocītu hemotaksei plaušās būtiska nozīme ir elpceļu epitēlijam un makrofāgiem, kas sintezē limfocītu hemotakses faktorus, no tiem svarīgākie ir CXCR3 un IP-10 (Barnes, 2003).

CD8 limfocītiem ir būtiska nozīme HOPS attīstībā, jo tie izdala vairākus citokīnus, piemēram, IL-6, IL-8 un TNF α , kā arī izraisa alveolocītu citolīzi un apoptozi, sintezējot perforīnus un granzīmus (Finkelstein, 1995; Rahman, 2000).

Ir pierādīts, ka CD8 limfocītu citokīnu produkcija ir saistāma ar NF- κ B aktivāciju šajās šūnās (Di Stefano, 2000). Turklāt, CD8 limfocīti var ekspresēt hemokīna receptorus, īpaši svarīgi ir CXCL10 (Maeno, 2007).

Ir iegūta korelācija starp apoptotisku šūnu skaitu un CD8 T-limfocītu skaitu alveolās (Majo, 2001), kas norāda, ka CD8⁺ T-limfocītiem ir nozīme epitēlija un endotēlija šūnu apoptozē. Tas arī izriet no šo šūnu funkcijas, kas ir saistīta ar vīrusu inficētas šūnas citolīzi vai apoptozes inducēšanu. Turklāt, CD8 limfocīti spēj izdalīt perforīnus un granzīmus, bojājot elastiskās šķiedras un veicinot plaušu emfizēmas attīstību.

2.5.7. CD4 limfocītu nozīme HOPS patoģenēzē

HOPS pacientiem ir palielināts aktivētu CD4⁺ T limfocītu skaits perifērajos elpceļos (Turato, 2002). T limfocīti HOPS pacientiem, atšķirībā no astmas, pārsvarā ir Th1 apakštipa, lai gan virknē pētījumu ir parādīta arī Th2 limfocītu nozīme HOPS patoģenēzē (Barnes, 2003).

Th1 apakštipa limfocītiem ir svarīga nozīme matricas metaloproteināžu (MMP) sintēzes kontrolē (Saetta, 2002). Eksperimentos ar dzīvniekiem ir parādīta emfizēmas attīstība, dzīvniekam ievadot sensibilizētus CD4⁺ T-limfocītus, kas būtībā ir oligoklonāli (Sullivan,

2005). Turklāt, HOPS pacientiem ir novērojamas antielastīna antivielas, kas liecina par iespējamu HOPS autoimūnu komponenti.

Palielināts CD4+ T limfocītu skaits HOPS pacientiem skaidrojams ar antigēnu stimulāciju caur *MHC* mehānismu. Antigēni aktivē dendrītiskās šūnas, kas no elpceļiem var migrēt reģionālajos limfmezglos un stimulēt limfocītu proliferāciju.

Naturālie killeri (CD56+ pozitīvās šūnas) ir svarīgi šūnu aizsardzībā pret vīrusu infekcijām. HOPS pacientiem ir novērots samazināts NK šūnu skaits asinīs (Prieto, 2001).

2.5.8. Elpceļu gludās muskulatūras nozīme HOPS patoģenēzē

Vairākos pētījumos HOPS pacientiem ir novērota izteikta gludās muskulatūras hipertrofija, kas negatīvi korelē ar elpceļu obstrukciju (Bosken, 1990; Saetta, 1999; Cosio, 1980). Smagas pakāpes HOPS pacientiem gludā muskulatūra ir hipertrofēta par 50% (Hogg, 2004).

Gludajai muskulatūrai piemīt ne tikai kontraktilās spējas, tā spēj arī izdalīt virkni citokīnu, hemokīnu, augšanas faktoru un proteāžu, piemēram, IL-6, TNF- α , CXCL-8, CXCL-10, TGF- β , CTGF (saistaudu augšanas faktors) [Chung, 2005; Hardaker, 2004].

2.5.9. Ekstracelulārā matricas izmaiņas HOPS pacientiem

Subepiteliālās bazālās membrānas sabiezēšanās HOPS nav tik raksturīga kā astmai, lai gan to novēro, īpaši tad, kad līdztekus ir vērojama eizinofilija.

Parasti palielinās 1. un 3. tipa kolagēna daudzums difūzi visā elpceļu sienā ar sekojošu lamināna pieaugumu gludajos miocītos (Kranenburg, 2006).

HOPS pacientiem perifērajos elpceļos novēro fibrozi adventīcijā, kas liecina par kolagēna izgulsnēšanās saistību ar elpceļu obstrukciju.

Turklāt, HOPS pacientiem ir novērota samazināta saistaudu pamatvielu proteoglikānu (dekorīns, biglikāns) ekspresija peribronhiāli un perifērajos elpceļos (Van Straaten, 1999).

2.5.10. Apoptoze plaušu šūnās

HOPS pacientiem novēro pastiprinātu endotēlija šūnu, alveolāro epitēlija šūnu un iekaisuma šūnu apoptozi (Segura-Valdez, 2000). Pētījumos arī tika parādīta pastiprināta endotēlija šūnu un alveolārā epitēlija šūnu apoptoze, kas raksturojas ar palielinātu kaspāzes-3 un samazinātu bcl-2 ekspresiju. Ir novērota VEGF (vaskulāra augšanas faktora) un tā receptoru ekspresijas samazināšanās plaušās HOPS pacientiem (Kasahara, 2001).

2.5.11. Citokīni un hemokīni

Tos iedala: sistēmiskas un lokālas darbības. Citokīniem un hemokīniem ir svarīga nozīme HOPS patoģenēzē, tie piesaista iekaisuma šūnas, rada elpceļu sienas pārstrukturēšanos, tai skaitā, kausveida glandulocītu hiperplāziju, epitēlija metaplāziju un sekmē emfizēmas attīstību.

2.5.11.1. Sistēmiskas darbības citokīni un hemokīni

Galvenie sistēmiskas darbības citokīni un hemokīni, kas ir svarīgi HOPS patoģenēzē, ir IL-6, IL-8, TNF- α , C reaktīvais proteīns, CXCL-8 un TNF- α receptors (Gan, 2004).

Pētījumos ir atrasta korelācija starp IL-6 un C reaktīvā proteīna līmeni asinīs un elpceļu obstrukciju- FEV₁% (Agusti, 2005; Broekhuize, 2006).

Oksidatīvais stress un iekaisums izraisa skeleta muskulatūras apoptozi, to disfunkciju, kas ir saistīta ar ķermeņa masas zudumu HOPS pacientiem (Agusti, 2002).

Sistēmisku citokīnu avots ir gan plaušu šūnas, gan asinīs cirkulējošie monocīti (de Godoy, 1996). Turklāt, HOPS pacientiem ir novērojama pastiprināta IL-6 un TNF α ekspresija starpribu muskuļaudos (Casadevall, 2007).

2.5.11.2. Plaušu citokīni un hemokīni

Inducēto krēpu un BAL šķidrums pētījumi liecina, ka HOPS pacientiem ir palielināta IL-1 β , IL-6, GM-CSF (granulocītu makrofāgu kolonijstimulējošais faktors), TNF- α , CCL-1, CCL-3, CCL-4, CCL-11 ekspresija plaušās (Keatings, 1996; Traves, 2002; Morrison, 1998; Kuschner, 1996; Pesci, 1998; Balbi, 1997; Chung, 2008).

Palielināta hemokīna CCL2 un tā receptora CCR2 ekspresija norāda uz monocītu un nenobriedušo dendrītisko šūnu palielinātu skaitu HOPS pacientiem (de Boer, 2000).

HOPS pacientu krēpās ir palielināta CCL20 ekspresija (Demedts, 2007). Tabakas dūmi aktivē CXCL8/IL-8 gēna ekspresiju epitēlija šūnās, kā arī IL-6 un TNF α ekspresiju alveolārajās makrofāgās, iesaistot NF- κ B signālmehānismu (Nishikawa, 1999).

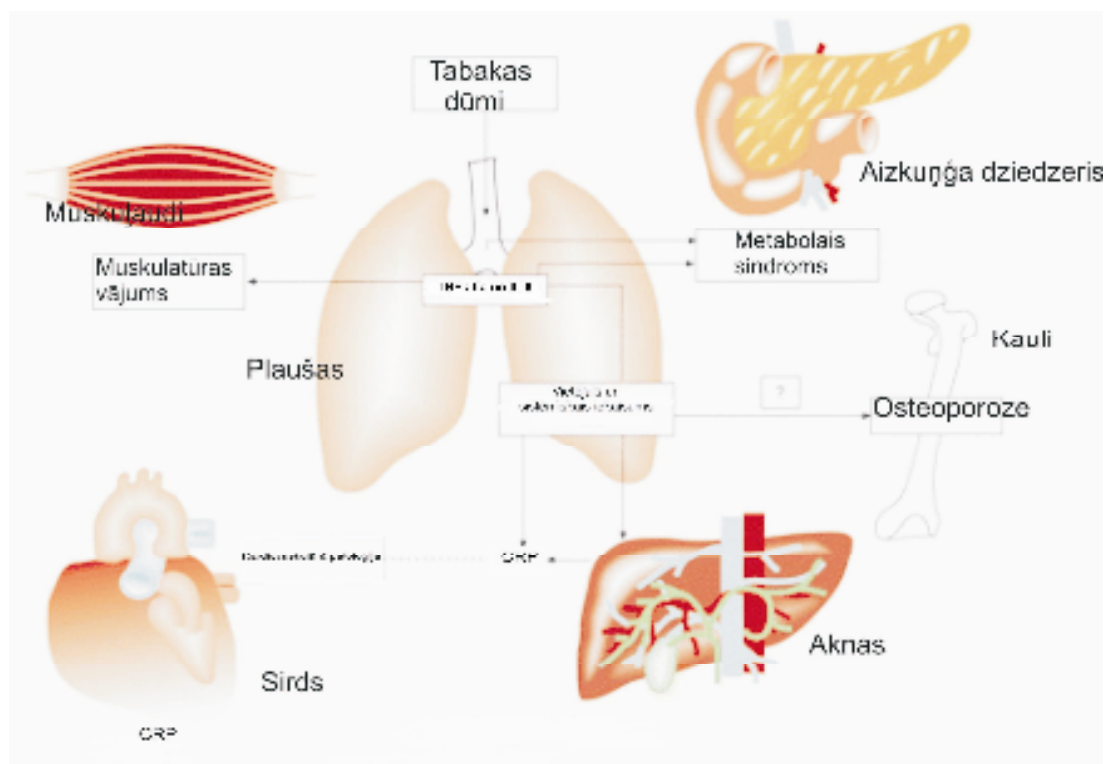
HOPS pacientiem ir palielināts CD8⁺ T-limfocītu skaits elpceļos, kas aktīvi sintezē IFN- γ un ekspresē hemokīna receptoru CXCR3, savukārt, epitēlija šūnām ir šī receptora ligands CXCL-10, kas ir spēcīgs hemotakses faktors Th1 limfocītiem (Di Stefano, 2001).

Lai gan pētījuma dati liecina, ka HOPS ir raksturīgas Th1 reakcijas, tomēr ir norādes uz to, ka Th2 šūnu atbilde arī ir vērojama HOPS pacientiem, lai gan ne tik izteikti, kā astmas gadījumā. Lai gan IL-5 ekspresija nav raksturīga HOPS pacientiem, pat ja vērojama eozinofīlija, toties ir vērojama citu mediatoru paaugstināta ekspresija, kā eozinofilo leikocītu hemotakses faktors un RANTES (Zhu, 2001).

Hroniska bronhīta pacientiem ir palielināta IL-4 ekspresija (Zhu, 2007).

HOPS pacientu makrofāgiem ir raksturīga palielināta IL-18, bet samazināta IL-13 ekspresija (Boutten, 2000).

Dzīvnieku modeļos ir parādīta IL-13 nozīme emfizēmas attīstībā. Palielināta citokīna IL-13 ekspresija, ko izdala Th2 limfocīti, izraisa emfizēmu, gļotu hipersekreciju, iekaisuma šūnu-makrofāgu, limfocītu un eozinofilo leikocītu infiltrāciju elpceļos, kā arī palielinā MMP sintēzi (Zheng, 2000). Matrices metaloproteāzēm ir vadošā nozīme emfizēmas attīstībā.



7. attēls. Sistēmisko citokīnu ietekme uz audiem un orgāniem HOPS pacientiem (angl. The influence of systemic cytokines on different tissue and organs in COPD), adaptēts un pilnveidots no Fabbri, 2008. Tabakas dūmi ietekmē plaušās tiek producēta virkne citokīnu, tai skaitā TNF α un IL-6. Tajā pašā laikā gan TNF α , gan tabakas dūmi veicina C reaktīvā olbaltuma (CRP) līmeņa paaugstināšanos, kas, savukārt, ir saistīts ar sirds un asinsvadu slimībām. Oksidatīvais stress, ko novēro HOPS pacientiem, palielina diabēta un osteoporozes risku, kā arī ietekmē skeleta muskulatūras darbību.

Iepriekš minēto patoģenētisko mehānismu rezultātā notiek HOPS raksturīga elpceļu pārstrukturēšanās, kas izpaužas ar elpceļu sabiezināšanos, to sienīņās notiek pastiprināta kolagēna izgulsnēšanās, kā rezultātā samazinās elpceļu lūmens, kas rada ventilācijas mazspēju. Turklāt, ir novērots, ka HOPS pacientiem pastiprināti veidojas limfoidālie folikuli plaušu audos. To veidošanās mehānisms vēl līdz galam nav izpētīts, taču uzskata, ka tas var būt saistīts ar pastiprinātu baktēriju kolonizāciju, kas provocē HOPS paasinājumus (Chung, 2008).

2.6. Oksidatīvais stress

No tabakas dūmiem vai no šūnām izdalītie oksidanti izjauc oksidantu/antioksidantu balansu (Rahman, 2000). Tabakas dūmi ir bagātīgs oksidantu avots. Tie satur vairākus komponentus: dūmu darvas komponentu un gāzes komponentu (MacNee, 1999; Rahman, 2000).

Tabakas dūmu darvas komponents satur hinona-hidrohinona reducēšanas oksidēšanas kompleksu, kas reducē O_2 par $O_2^{\cdot-}$, savukārt, tabakas dūmu gāzes komponents satur vairāk kā 10^{16} organisko radikāļu no vienas cigaretes (Lannan, 1994; MacNee, 1999). Tie, galvenokārt, ir oglekļa un slāpekļa radikāļi (piem., peroksinitrīts), kā arī alkēni un diēni.

Reaktīvie skābekļa radikāļi ir svarīgi iekaisuma atbildē. Tie aktivē NF- κ B un aktivētājproteīnu (AP-1), kā mitogēnu aktivētās kināzes (MAP) un fosfoinozīd-3-kināzes, kas stimulē iekaisumam raksturīgu gēnu ekspresiju.

Pētījumos ir pierādīts, ka oksidatīvais stress veicina mitohondriju disfunkciju, tā rezultātā pastiprinās šūnu apoptozi, ko pastarpina nikotinamīda dinukleotīda atkarīgā sirtuīna deacetilāze, SIRT1 (Rajendrasozhan, 2008). Tabakas dūmiem piemīt arī virkne citu efektu, piemēram, tie nomāc fibroblastu proliferāciju (Nakamura, 1995).

Ekspozīcija ar tabakas dūmu ekstraktiem nomāc fibroblastu šūnas ciklu caur p53 un p16, tā rezultātā samazinās plaušu atjaunošanās spējas un epitēlija šūnu proliferācija (Palange, 2006; Wang, 2001).

Līdzīga ietekme tabakas dūmu komponentiem ir uz alveolārā epitēlija šūnām, kuros tie inducē β -galaktozidāzes aktivitāti, stimulē lipofuscīna uzkrāšanos, un palielina ciklīna atkarīgās inhibētājkināzes p21 ekspresiju (Tsuji, 2004).

2.6.1. Reaktīvo skābekļa radikāļu izraisīta lipīdu peroksidācija un to nozīme plaušu iekaisuma attīstībā

Apkārtējā vide, galvenokārt, ozons un tabakas dūmi, kā arī iekaisuma šūnas ir galvenais brīvo radikāļu avots. Svarīgākais brīvo radikāļu producēšanās posms ir saistīts ar NADPH posmu.

Reaktīvajiem skābekļa radikāļiem (ROS) piemīt stipra reaģētspēja, tādējādi tie rada membrānas lipīdu peroksidāciju un to produktu-malondialdehīdu, 4-hidroksi-2-nonenālu, akroleīnu un F2 izoprostānu uzkrāšanos (Rahman, 2000).

F2 izoprostāni veidojas no arahidonskābes lipīdu peroksidācijas neenzimātiskā ceļā bez ciklooksigenāzes klātbūtnes. F2 izoprostāns veidojas *in situ* oksidējoties lipīdiem un tad tiek aktivēts ar fosfolipāzes palīdzību. Tas darbojas caur prostaglandīna receptoriem un rada gludās muskulatūras saraušanos. Tas arī ietekmē trombocītu un makrofāgu funkcijas (Rahman, 2000).

4-hidroksinonenāls ir difundētspējīgs lipīdu peroksidācijas gala produkts, kas darbojas kā neitrofilo leukocītu hemotakses faktors. Turklāt, tas regulē vairākas šūnu funkcijas, tai skaitā šūnu proliferāciju un apoptozi.

4-hidroksinonenāla modificētu proteīnu līmenis ir izteikti palielināts alveolārā epitēlija šūnās, neitrofilajos leukocītos un endotēlijā pacientiem ar HOPS, salīdzinot ar veselīgiem indivīdiem (Rahman, 2002). Pētījumos ir konstatēts, ka 4-hidroksi-2-nonenāls aktivē glutaciona sintēzi, inducējot glutaciona cisteīnligāzes gēnu. Tas aktivē arī virkni iekaisuma mediatoru - IL-8, monocītu hemotakses faktoru, ciklooksigenāzi-2, epidermas augšanas faktoru un mucīnu 5AC. Tas viss liecina, ka 4-hidroksi-2-nonenāls darbojas kā signālmolekula, ietekmējot gēnu transkripciju (Rahman, 2002; Liu, 1999; Liu, 2000).

Akroleīns ir tiola reaktīvs α - β -polinepiesātināts aldehīds, kas lielā daudzumā sastopams tabakas dūmos (Laguer, 1993). Akroleīna inhalācija izraisa iekaisumu žurkām deguna gļotādā un alveolārajās A549 šūnās (Casseo, 1996; Kehrer, 2000).

Akroleīna ekspozīcija žurku modeļos rada izteiktu bronhu epitēlija nolobīšanos un iekaisumu (Arumugam, 1999). Turklāt, akroleīna ekspozīcija izraisa makrofāgu aktivāciju un prostaglandīnu E2 un F2 α sintēzi (Casseo, 1996; Kehrer, 2000).

Tajā pašā laikā akroleīns ir alkilējošs aģents ar tam piemītošām mutagēnām un karcinogēnām īpašībām, tas palielina nikotinamīda adenīdinukleotīda fosfāta hidroksihinona oksireduktāzes mRNS līmeni (Rahman, 2002).

Pētījumos, izmantojot *western blot* analīzi, ir parādīts, ka akroleīns izraisa transkripcijas faktora Nrf2 ekspresiju. Šis gēns ir svarīgs emfizēmas attīstībā (Rangasamy, 2004). Nrf2 gēns kontrolē vairāku antioksidantu sintēzi. Pēdējie dati dzīvnieku modeļos liecina, ka akroleīns var nomākt iekaisuma reakcijas epitēlijšūnās, samazinot tajās IL-8 sintēzi (Valacchi, 2005).

2.6.2. Antioksidanti

Organismā šūnu aizsardzību pret oksidantiem nodrošina antioksidanti, kuri iedalās neenzimātiskajos un enzīmātiskajos. Neenzimātiskie antioksidanti: reducētais glutations (GSH), urīnskābe, vitamīni C, E un mikroelementi - cinks, selēns, magnijs u.c. (Jurka, 2001; Rahman, 2000).

Galvenie antioksidatīvie enzīmi ir superoksīda dismutāze, kura no superoksīda anjona O_2^- veido H_2O_2 , katalāze, kura neitralizē H_2O_2 , veidojot H_2O , un glutaciona peroksidāze, kura inaktivē gan H_2O_2 , gan HOCl un lipīdu peroksīdus ar glutaciona reducēšanas oksidēšanas sistēmas palīdzību (Cho, 2000; Gatler, 1995; Koyoma, 1998; Rahman, 1995). Viena no galvenajām antioksidantu sistēmām ir glutaciona sistēma.

Glutations (GSH) ir tripeptīds, kas satur tiola grupu. Glutaciona sintēzē svarīga nozīme ir enzīmiem - γ -glutamilsteīna sintēzei un γ -glutamiltranseptidāzei, kā arī tādām aminoskābēm kā glicīns, cisteīns un glutamātskābe (Moellering, 1999; Rahman, 2000). Glutaciona sistēma uztur reducētā /oksidētā glutaciona homeostāzi. Šī sistēma izmanto glutacionu kā substrātu peroksīdu detoksikācijā (H_2O_2 , lipīdu peroksīdi).

Reakciju katalizē enzīms - glutaciona peroksidāze. Tā rezultātā veidojas oksidētais glutations, kas pēc tam, ar glutaciona reduktāzes palīdzību, tiek pārveidots par glutacionu (Liu, 1998; Li, 1999; Rahman, 1999).

Tādi faktori kā oksidanti (tabakas dūmi, hidrogēnperoksīds, ozons, hiperoksija), citokīni (TNF- α , IL-1 β), slāpekļa oksīds, jonizējošais starojums, smagie metāli (selēns, kadmijs), inducē γ -glutamilsteīna un glutaciona sintēzi, bet, savukārt, TGF- β , cAMP un prostaglandīns E nomāc glutaciona sintēzi (Morales, 1997; Morales, 1998; Phelps, 1995; Sekhar, 1997; Tu, 1998).

Rahman et al. ir parādījis, ka intracelulārā glutaciona līmenis, pēc TNF- α iedarbības, bronhu epitēlijšūnās samazinās (Rahman, 1999). Tā iemesls ir glutaciona oksidēšanās. Taču tam seko ātra glutaciona līmeņa palielināšanās.

Ir parādīts, ka cilvēkiem γ -glutamilsteīna gēnu regulācijā nozīme ir c-Jun homodimēram (Phelps, 1995; Sekhar, 1997). NF- κ B aktivācijas nomākšana kavē γ -glutamilsteīna gēna

ekspresiju (Iwanga, 1998), savukārt, plaušu epitēlijšūnu A549 ekspozīcija ar deksametazonu samazina šajās šūnās glutaciona līmeni (Hatcher, 1995; Rahman 2000).

Eksperimentos ar dzīvniekiem ir parādīts, ka svarīga nozīme iekaisuma atbildes reakcijā ir transkripcijas faktoram (kodola eritroīds faktors-2 – Nrf-2), kas izraisa virkni gēnu ekspresiju, no tiem svarīgākie ir: superoksīddismutāze, glutatioperoksidāze un peroksiredoksīns (Hackett, 2003; Pierrou, 2007; Sigh, 2000). Otrā apakštipa pneimocītos, kas tika iegūti no Nrf2 *knockout* pelēm, novēroja pastiprinātu jutību pret oksidantiem un lielāku uzņēmību emfizēmai (Rangasamy, 2004; Reddy, 2007).

2.6.3. γ -glutamilsteīna sintetāzes nozīme ģenētiski predisponētu plaušu slimību attīstībā

Pētījumos tika parādīts, ka glutaciona līmeņa regulācija ir viens no faktoriem, kas nosaka ģenētisko predispozīciju oksidatīvam stresam plaušās, kas, savukārt, ir svarīgākais HOPS riska faktors.

γ -glutamilsteīna sintetāzes (γ -GSC) gēna polimorfisms nosaka šūnu aizsardzību pret oksidatīvu stresu (Barnes, 1999; Koyama, 1998).

Ģenētiskie pētījumi liecina, ka γ -GSC gēnam *GAG* trinukleotīda atkārtojuma 5' galā piemīt polimorfisma raksturs gan kodējošos, gan nekodējošos γ -GSC gēna segmentos.

Pētījumā tika atrasts vairāku alēļu polimorfisms dažādās populācijās, no tiem svarīgākās ir trīs alēles: A1 (9 atkārtojumi ar 33% frekvenci), A2 (8 atkārtojumi ar 11% frekvenci), A3 (7 atkārtojumi ar 54% frekvenci).

Ģenētiskās analīzes liecina, ka γ -GSC polimorfisms ir saistīts ar A un T mutācijām/transversijām 1109. nukleotīda vietā, kas noteica histidīna aizvietošanu 370. pozīcijā (Beutler, 1999).

γ -GSC subvienību gēni lokalizējas dažādās hromosomās un tās mRNS ekspresija atšķiras dažādās šūnās. Cilvēkos γ -GSC-HS subvienības gēns atrodas 6. hromosomā (6p12), bet γ -GSC-LS – 1. hromosomā (1p21). Populācijas mērogā pastāv gēna polimorfisms (delēcijas vai mutācijas) 5' kodējošā/nekodējošā γ -GSC-HS un γ -GSC-LS gēnos (Sierra-Rivera, 1996; Tsuchiya, 1995; Walsh, 1996).

Pētījumos atklāts, ka γ -GSC mRNS ekspresija ir paaugstināta smēķētāju plaušās, un šis efekts ir vairāk izteikts HOPS pacientiem. Turklāt, tika novērots, ka, pakļaujot žurkas tabakas

dūmu ekspozīcijai, paaugstinās superoksīddismutāzes, metalotionīnperoksidāzes, hēma oksigenāzes un glutaciona peroksidāzes gēnu ekspresija bronhu epitēlija šūnās, kas liecina par antioksidantu gēnu adaptīvo aktivitātes regulāciju tabakas dūmu ietekmē (Rahman, 2000; Gilks, 1998).

Glutaciona koncentrācijas izmaiņas endotēlija šūnās stimulē dažādu adhēzijas molekulu ekspresiju uz šūnas virsmas. Šīs molekulas sekmē neitrofilo leukocītu adhēziju pie endotēlija. Ūdeņraža peroksīds izraisa epidermālā augšanas faktora (EGF) receptora tirozīna atlieku fosforilāciju un stimulē apoptozi, kas ir iesaistīta HOPS patoģenēzē (Liu, 1998).

Hēma oksigenāze-1 (HO-1) ir viens no karstuma šoka proteīniem (HSP), un tai ir svarīga nozīme iekaisuma attīstībā. Pētījumi liecina, ka glutatons var aktivēt HSP (Lautier, 1992; Liu, 1996).

2.6.4. Oksidantu stimulēti mitohondriju bojājumi

Mitohondriji ražo daudz skābekļa brīvo radikāļu, kuru lielākā daļa noārdās glutaciona atkarīgā peroksidāzes katalizētās reakcijās. Mitohondrijos atrodas 15-20% no kopējā intracelulārā glutaciona.

Mitohondriālo glutaciona koncentrāciju ietekmē arī oksidatīvais stress. Glutaciona oksidācija ir saistīta ar NF- κ B aktivāciju, mitohondriālās DNS bojājumiem, kas stimulē šūnu apoptozi. Mitohondriālā glutaciona koncentrācijas samazināšanās cilvēku nabas vēnas endoteliocītos sekmēja TNF- α stimulētu VCAM-1, bet ne ICAM-1 ekspresiju, un mononukleāro limfocītu adhēziju pie endotēlija (Arai, 1999; Chen, 1999; Esteve, 1999; Fernandez-Chece, 1998, Meister, 1999).

2.6.5. Oksidantu stimulēta ekstracelulāra matricas pārbūve

Oksidanti ietekmē plaušu elastiskā karkasa pārstrukturēšanos (Tyagi, 1999; Foda, 1999). Šo apgalvojumu apstiprina vairāki pētījumi. Pirmkārt, mākslīgais matricas metaloproteināžu inhibitors nomāc oksidantu stimulēto plaušu bojājumus, bet, otrkārt, intracelulārā glutaciona koncentrācijas samazināšanās stimulē MMP aktivāciju, tādējādi veicinot ekstracelulārā matricas degradāciju (Chai, 1994).

Paaugstināta glutationa koncentrācija nomāc MMP-2 un MMP-9 atkarīgu plaušu elastiskā karkasa bojājumu. Pētījumos parādīts, kā ozona izraisīts oksidatīvais stress samazina glutationa koncentrāciju plaušās un izmaina ekstracelulārā matricsa kolagēna gēna ekspresiju. Savukārt, tādi tiola antioksidanti kā n-acetilcisteīns nomāc MMP-2 un MMP-1 aktivāciju fibroblastu šūnu kultūrā (Hagen, 1999; Rahman, 2000, Tyagi, 1999).

Tādējādi var secināt, ka sākotnējs mērens oksidatīvais stress izraisa adaptīvu rezistenci, nodrošinot antioksidatīvu aizsardzību pret sekojošu spēcīgāku stresu (Heffner, 1989).

Vienai daļai smēķētāju oksidatīvā stresa apstākļos paaugstinās antioksidatīvo fermentu aktivitāte, turpretim, citiem to nenovēro. Šo pretrunu izskaidro ģenētiski faktori. Tas ir saistāms, galvenokārt, ar glutationa transferāzes un mikrosomālās epoksīda hidroksilāzes gēna polimorfismu (Beutler, 1999; Cantlay, 1994; Ishii, 1999; Yim, 2000; Sekhar, 1997; Rahman, 2000).

2.6.6. γ -glutamyltranspeptidāzes nozīme glutationa līmeņa regulācijā plaušās

γ -glutamyltranspeptidāze (γ -GT) ir svarīgs enzīms glutationa līmeņa regulācijā. γ -GT šķeļ ekstracelulārā glutationa veidojošās aminoskābes, kas noved pie intracelulārā glutationa resintēzes (Griffith, 1979).

γ -GT ir plazmas membrānas enzīms, kura aktīvā daļa ir lokalizēta uz šūnas virsmas. Šis enzīms šķeļ γ -glutamylcisteīnglicīna γ -glutamilsaiti. Glutamila atlikums pēc tam tiek pārveidots aminoskābē, dipeptīdā vai glutationā, veidojot γ -glutamila atvasinājumus. Tādējādi, γ -GT ir nepieciešams intracelulārā glutationa sintēzē (About, 1984; Griffith, 1979; Berggren, 1981; van Klaveren, 1994; Rahman, 1998; Rouzer, 1982).

2.7. Gļotādas tolerances zudums HOPS pacientiem

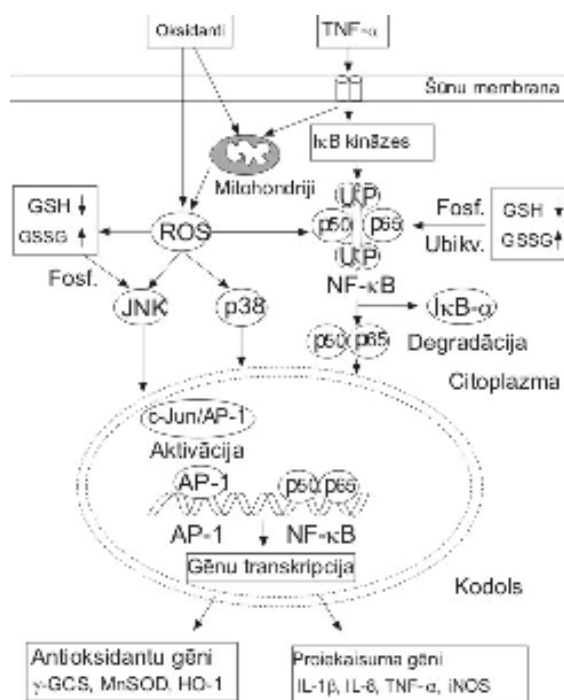
Pēdējā laikā parādās dati par to, ka HOPS gadījumā tiek zaudēta gļotādas tolerance. Rezultātā pastāvīga antigēna invāzija pat nelielās devās (piemēram, rezidentmikrofloras antigēni, vīrusi) izraisa imūnatbildi hroniska iekaisuma veidā.

Tolerances uzturēšanā izšķiroša nozīme ir adekvātai antigēnprezentētājšūnu (CD 86 un CD 80 pozitīvās dendrītiskās šūnas), T regulatoro limfocītu un B limfocītu diferenciācijai un

mijiedarbībai (Pons, 2005). Ja nenotiek adekvāta šo šūnu mijiedarbība, tad samazinās regulatoru citokīnu-IL-10 un TGF- β izdalīšanās, kas veicina NF- κ B aktivāciju (Pilette, 2004).

2.8. Nukleārā faktora- κ B aktivācija

Inhalētie vai no šūnām izdalītie oksidanti izraisa redoks-jūtīgā transkripcijas faktora NF- κ B aktivāciju. Lipīdu peroksidācijas produkti, oksidētais glutations izraisa NF- κ B inhibitora ubikvitinēšanu un fosforilēšanu, tādējādi atbrīvojot p65/p50 kompleksu (Barnes, 1998; Bowie, 1997; Rahman, 2000, Rajendrasozhan, 2008).



8. attēls. NF- κ Bp65 un AP-1 (aktivētājproteīna 1) aktivācijas shēma (angl. NF- κ B activation pathway). No tabakas dūmiem un no iekaisuma šūnām izdalītie oksidanti, kā arī TNF- α (tumora nekrozes faktors α) ietekmē mitohondrijus, kuros papildus tiek veidoti skābekļa brīvie radikāļi. NF- κ B aktivācijā ir iesaistīti fosforilācijas un ubikvitinēšanās procesi ar sekojošu NF- κ B inhibētājproteīna (I κ B) noārdīšanos, NF- κ B translokāciju kodolā un saistīšanos ar specifisku DNS sekvenci. Intracelulārā reducētā (GSH) un oksidētā glutationa (GSSG) attiecība ietekmē NF- κ B ekspresiju. Līdzīgi, c-jun N terminālās proteīnkināzes (JNK) fosforilēšanās rezultātā, aktivējas c-jun/c-jun (homodimērs) vai c-fos/c-jun (heterodimērs), kuri aktivē AP-1 aktivāciju. γ -GCS- γ -glutamilsteīna sinteāze; MnSOD-superoksīda reduktāze; HO-1-hēma oksigenāze-1; Fosf-fosforilācija; Ubikv-ubikvitinēšana; p38-p38 kināze; p50, p65-NF- κ Bp65 subvienības (adaptēts no Rahman, 2000).

Nukleārais faktors- κ B ir transkripcijas faktors, kas saistās ar specifisku DNS sekvenci. Tas pirmo reizi tika identificēts kā faktors, kas saistās ar dekamērisku DNS sekvenci 5'-GGGACTTTCC-3' B šūnu vieglās ķēdes imūnglobulīna gēnā (Christman, 2000; Rahman, 1998).

NF- κ B pieder pie Rel proteīnu dzimtas. Šai dzimtai ir raksturīgs kopīgs 300 aminoskābju homologiskais NF- κ B/Rel domēns. NF- κ B sastāv no vairākām apakšvienībām NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p65) un p105.

Šis transkripcijas faktors ir atrodams šūnu citoplazmā neaktīvā kompleksā, saistībā ar to inhibētājproteīnu I κ B. Šūnu aktivācija ar vairākiem stimuliem izraisa I κ B fosforilēšanu un p105/ p65 kompleksa ubikvitinēšanu. Aktīvs p65/p50 heterodimērs translocējas kodolā, kur p50 atvieglo p65 saistīšanos ar DNS un izraisa gēnu transkripciju.

Ir vairāki NF- κ B aktivētāji - gan citokīni (TNF α un TNF β , IL-1 β , IL-2, IL-6) un oksidanti (tabakas dūmi, hiperoksija, ozons), gan augšanas faktori (GM-CSF), baktērijas un vīrusi (gripas vīruss, adenovīruss), gan arī lipopolisaharīdi, hipoksija un ultravioletais starojums (Barnes, 1997; Dummount, 1999; Lakshminarayanan, 1996).

TNF α , TNF β , IL-1 β , IL-2, IL-6, lipopolisaharīdi un ultravioletais starojums aktivē NF- κ B, palielinot reaktīvā skābekļa radikāļu atbrīvošanos no mitohondrijiem, kas tieši aktivē šo faktoru (Rahman, 2000).

Savukārt, hiperoksija un ozons aktivē NF- κ B, pastiprināt oksidētā glutaciona uzkrāšanos, kas sekmē p105/p65 ubikvitinēšanu un NF- κ B aktivēšanos (Duan, 1996; Rahman, 2000).

Tādējādi var secināt, ka NF- κ B izraisa to gēnu ekspresiju, kas sekmē iekaisuma procesu (skat. 2.tabulu).

Di Stefano et al. ziņo, ka HOPS pacientiem ir palielināts NF- κ Bp65 pozitīvo šūnu skaits centrālajos elpceļos (Di Stefano, 2002).

Savukārt, *Caramori et al.* ziņo, ka makrofāgi HOPS paasinājuma laikā ir galvenās iekaisuma šūnas, kurās NF- κ Bp65 ir aktivēts (Caramori, 2003).

NF- κ Bp65 var aktivēt dažādi toksiskie aģenti, piemēram, mūsu iepriekšējie pētījumi liecina, ka anti-HIV preparāti - azidotimidīns, stavudīns, lamivudīns aktivē NF- κ Bp65 ekspresiju kardiomiocītos, taču mildronāts spēj samazināt NF- κ Bp65 ekspresiju šajās šūnās (Klusa, 2006; Isajevs, 2007; Pupure, 2008).

2. tabula. Gēni, kurus regulē NF- κ B (angl. Genes regulated by NF- κ B). TNF- α -tumora nekrozes faktors α ; IFN- β -Interferons β ; LMP2-lielā multifunkcionālā peptidāze-2

Citokīni un augšanas faktori	Interleikīns 2 Interleikīns 6 Interleikīns 8 Interleikīns 12 TNF α IFN- β Granulocītu-makrofāgu kolonijstimulētājfaktors (GM-CSF)
Adhēzijas molekulas	Endotēliālā leikocītu adhēzijas molekula-1(ELAM-1) Starpšūnu adhēzijas molekula-1(ICAM-1) Vaskulāro šūnu adhēzijas molekula-1 (VCAM-1)
Šūnu virsmas receptori	T šūnu receptors β 2mikroglobulīns
Citi	iNOSintetāze LMP2 proteasomu subvienība

2.8.1. NF- κ B un gēnu ekspresijas regulācija

Lai notiktu gēnu ekspresija nepieciešamas hromatīna strukturālās pārmaiņas. Gēnu ekspresija un represija saistīta ar hromatīna struktūras enzimatisku modifikāciju. Histonu struktūra ir bagāta ar lizīnu, kas var tikt acetilēts.

Neaktīvās šūnās DNS ir saritināta ap histonu oktomēru, tādējādi, neļaujot saistīties RNS polimerāzei-2. Gēnu transkripcija notiek, ja DNS ir atritināta un ir izmainīta hromatīna struktūra (Murray, 1988; Urnov, 2001).

Ja NF- κ B ir aktivēts, tas saistās ar DNS un mijiedarbojas ar CBP (cikliskā cAMP saistošais proteīns), p300 un p300/CBP asociēto faktoru (PCAF). Šīm koaktivatoru molekulām piemīt histonu acetiltransferāzes aktivitāte, kas acetilē histonus, tādējādi mainot to struktūru un izraistot DNS atritināšanos. Rezultātā ar to saistās TATA-box saistošais proteīns (TBP), TBP-asociētais faktors un RNS polimerāze-2, kas ierosina gēnu transkripciju (Barnes, 1997, 2005; Thompson, 2001).

Kopumā pašlaik ir noskaidrotas vairāk nekā 20 histonu acetiltransferāžu formas (Pazin, 1997; Barnes, 1999).

Savukārt, histonu deacetilācija (histonu deacetilāzes, HDAC) izraisa DNS saritināšanos, tādējādi, apstādinot gēnu ekspresiju.

Pašlaik ir zināmas 12 HDAC formas (Bertos, 2001). HDAC4 un HDAC5 piemīt īpašība translocēties starp kodolu un citoplazmu (Bertos, 2001).

HOPS gadījumā alveolārajos makrofāgos ir samazināta HDAC2 aktivitāte, kas var tikt izskaidrots ar to, ka tabakas dūmi inaktivē HDAC2 (Ito, 2000; Ito, 2001; Barnes, 2004; Barnes, 2005). HDAC2 aktivitātes samazināšanās ir saistīta ar palielinātu iekaisuma citokīnu TNF- α un IL-8 līmeni (Barnes, 2000). *In vitro* novērots, ka teofilīns seškārtīgi palielina HDAC2 aktivitāti alveolārajos makrofāgos HOPS pacientiem un palielina deksametazona antiiekaisuma darbību (Cosio, 2004; Ito, 2002).

2.8.2. Aktivētājproteīns-1, AP-1

AP-1 sastāv, galvenokārt, no Jun un Fos gēnu produktiem, kuri var veidot gan homodimēru (Jun/Jun), gan heterodimēru (Jun/Fos) kompleksus (Abate, 1999; Bergelson, 1994).

Tādi antioksidanti kā N-acetilcisteīns palielina nestimulēto un 12-O-tetradekanoīl-forbol-13-acetāta stimulēto AP-1 piesaistīšanos pie DNS un tās transaktivāciju *HeLa* šūnās. Tas varbūt saistīts ar sulfhidrila grupu, kas ir nepieciešama, lai AP-1 spētu piesaistīties DNS. AP-1 piesaistīšanos pie DNS stimulē tioredoksīns, kodola redoksproteīns, Ref-1 (Galter, 1994; Hirota, 1997).

Savukārt, AP-1 piesaistīšanos pie DNS vairāku šūnu tipos nomāc reducētais glutations. Iespējams, to var izskaidrot ar to, ka disulfīdu saišu veidošanās starp cisteīna atliekumiem nomāc AP-1 piesaistīšanos pie DNS.

Turklāt, oksidatīvais stress, kuru pavada ūdeņraža peroksīda līmeņa paaugstināšanās un intracelulārā glutaciona koncentrācijas samazināšanās, ko izraisa oksidētā/reducētā glutaciona attiecības līmeņa paaugstināšanās, arī stimulē AP-1 piesaistīšanos pie DNS (Wilhelm, 1997).

Šis fakts ļauj izvirzīt hipotēzi, ka pastāv arī cits mehānisms, izņemot tiešu DNS/proteīna saistību, ko novēro, piemēram, redoks-jūtīgā intracelulārās signalizācijas aktivācijas laikā, kas

var regulēt AP-1 aktivāciju. Šī hipotēze saskan ar *Wilhelm et al.* zinātnisko darbu, kurā tika parādīts, ka izmaiņas cellulārā tiolu redokssistēmā ir signāls AP-1 aktivācijai, kas realizējas caur c-Jun-N-terminala-proteīn kināzes (JNK) vai p38 kināzes signālceļu (Meyer, 1993; Wilhelm, 1997; Devalia, 1993).

2.9. Mitogēnu aktivēto proteīnkināžu nozīme HOPS patoģenēzē

Mitogēnu aktivētās proteīnkināzes (MAPK) ir signālceļu enzīmi, kuru sastāvā ietilpst arī ekstracelulārās signāla regulējošās kināzes (ERK) un c-jun-NH₂ terminālās kināzes (JNK). MAPK veido trīs grupas, kuras aktivizē fosforilēšanās reakcijas.

ERK signālceļš tiek aktivizēts caur G-proteīnu saistītajiem receptoriem un augšanas faktoriem, toties JNK un p38 aktivizē citokīni.

Gan JNK, gan p38 ir nozīme iekaisuma uzturēšanā (Koch, 2004). p38 ir viena no tām kināzēm, kas pēctranskripcijas līmenī regulē vairāku citokīnu ekspresiju, tostarp, TNF- α , IL-1 β , IL-6 un IL-8.

Ir atklātas četras p38 izoformas- α , β , γ un δ . Ir parādīts, ka p38 ir aktivēta HOPS pacientu makrofāgos (Renda, 2008). Kā jau tika minēts, NF- κ B regulē vairāku iekaisuma molekulu ekspresiju. Tādiem citokīniem, kā IL-8, TNF- α un IL-1 β , mijiedarbojoties kopā, aktivējas mitogēnu-aktivēto proteīnkināžu p38 subvienība (Koch, 2004; Renda, 2008).

2.10. Histonu deacetilāzes (HDAC)

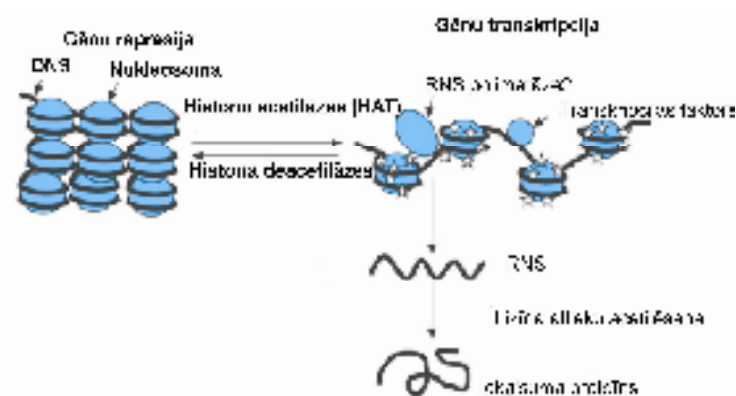
HDAC darbības pamatprincipi

Histonu acetilācija/deacetilācija ir viens no galvenajiem posmiem gēnu transkripcijas regulācijā, un to attiecīgi nodrošina histonu acetiltransferāzes (HAT) un histonu deacetilāzes (HDAC).

HDAC ir enzīmi, kas atšķel acetilgrupu no hiperacetilētajiem histoniem un nomāc noteiktu gēnu transkripciju. Respektīvi, HDAC inhibē to gēnu transkripciju, kuri kodē iekaisumu izraisošo un uzturošo citokīnu struktūrolbaltumvielas.

Dzīvnieku šūnās šobrīd ir atrasti 13 HDAC subtipi, kas tiek iedalīti divās klasēs. Pie pirmās klases pieder 1., 2., 3., 8. un 11. HDAC subtips. Pirmajai klasei piederošās HDAC parasti ir lokalizētas kodolā un ir atrodamas vairumā organismu šūnu. Pie otrās klases pieder 4., 5., 6., 7., 9. un 10. HDAC subtips, un šīs HDAC ir lokalizētas perinukleāri citoplazmā (Ito, 2001).

Hromatīna pārstrukturēšanai ir svarīga nozīme gēnu transkripcijā. Neaktivētā stāvoklī DNS ir cieši saritināta ap histoniem, izņemot RNS polimerāzes piesaistīšanās vietas. Gēnu transkripcija notiek, kad DNS ir atritināta.



9. attēls. Histonu deacetilāžu darbības pamatprincipi (angl. Mechanisms of HDAC2 action). Gēnu aktivāciju un represiju regulē histonu acetilēšana un deacetilēšana. Histonu acetilēšana izraisa nukleosomu atritināšanos un RNS polimerāzes saistīšanos pie specifiskām DNS sekvencēm, kas nosaka gēnu ekspresiju. Savukārt, histona deacetilāzes saritina DNS hromatīna struktūru, tādējādi neļaujot transkripcijas faktoriem un RNS polimerāzei saistīties pie DNS (adaptēts, no Barnes, 2005).

Taču HDAC piemīt spēja piedalīties ne tikai histonu deacetilācijā. HDAC1 un HDAC2 ir spējīgas deacetilēt acetilētu nukleāro faktoru- κ B (NF- κ B), veicināt tā saistīšanos ar I κ B- α un tā izvadi no kodola uz citoplazmu, tādējādi pārtraucot NF- κ B aktivitāti. Tāpēc HDAC1 un HDAC2 ir uzskatāmas par spējīgām arī tieši modulēt NF- κ B inducēto gēnu transkripcijas aktivitāti (Barnes, 2005).

Nikotinamīda adenīndinukleotīda atkarīgā deacetilāze sirtuīns 1 (SIRT-1) ir HDAC 3. tips, kuram pierādīta svarīga nozīme iekaisuma uzturēšanā un plaušu novecošanā. Sirtuīns nomāc p53 proteīnu un kavē šūnu apoptozi (Yang, 2007). Pēdējie dati liecina, ka sirtuīna līmenis HOPS pacientiem ir samazināts alveolārajās makrofāgās (Rajendrasozhan, 2008).

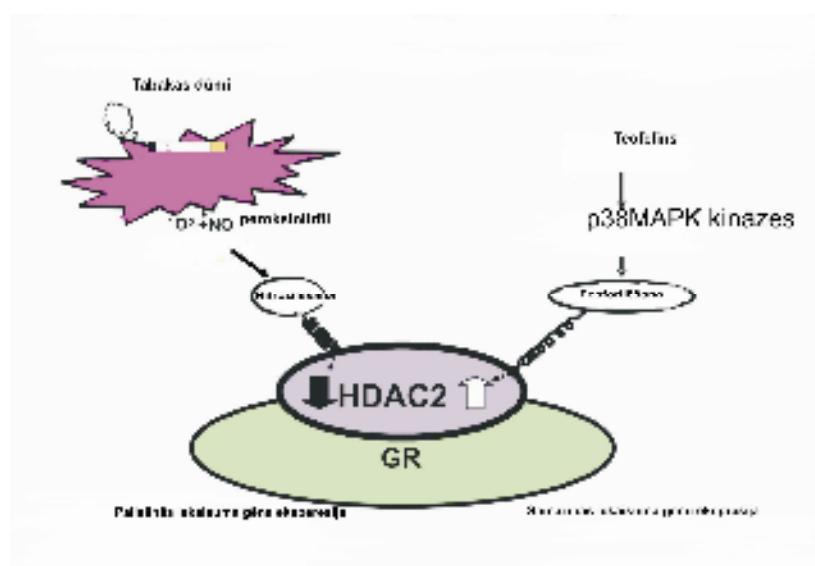
2.10.1. Otrā apakštipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresiju un aktivitāti ietekmējošie faktori

No tabakas dūmiem vai šūnām izdalītie skābekļa brīvie radikāļi izraisa oksidatīvo stresu, kura rezultātā elpceļu epitēlija šūnās notiek histonu acetilēšana.

Tā rezultātā notiek vairāku iekaisuma citokīnu, piemēram, IL-8 atbrīvošanās no epiteliocītiem; bet HDAC2 ekspresija samazinās (Barnes, 2005).

HDAC2 nomāc oksidatīvā stresa laikā izdalītie peroksinitrīti, kas nitrozilē HDAC tirozīna atliekas, tādējādi, nomācot enzīma aktivitāti (Ito, 2006; Ito, 2005).

No visa iepriekšminētā izriet, ka tabakas dūmi nomāc HDAC aktivitāti HOPS pacientiem. Jauni pētījumi norāda uz to, ka teofilīns zemās devās spēj aktivēt HDAC. Turklāt, tas novērš rezistenci pret glikokortikoidiem (Barnes, 2005; Cosio, 2004).



10. attēls. HDAC2 nomākšanas un aktivācijas mehānismi (angl. The mechanisms of HDAC2 deactivation and activation). No tabakas dūmiem izdalītie oksidanti, slāpekļa oksīds izraisa HDAC2 nitrozilēšanu ar sekojošu tās nomākšanu. Teofilīns, savukārt, mijiedarbojoties ar p38MAPK kināzēm caur fosforilācijas signālceļu, paaugstina HDAC2 aktivitāti. GR-kortikosteroīda receptors (adaptēts, no Cosio, 2004 un Barnes, 2005).

Tādējādi, literatūras dati liecina, ka no tabakas dūmiem vai no šūnām izdalītie oksidanti sekmē oksidantu/antioksidantu disbalansa attīstību plaušās, kam ir būtiska nozīme HOPS patoģenēzē. Dati ir iegūti, galvenokārt, analizējot inducētās krēpas un bronhu biopsijas materiālu. Tomēr, analizējot pasaules literatūru, mēs neatradām darbus, kur būtu pētīts, kurās centrālo un perifēro elpceļu šūnās NF- κ Bp65 un HDAC2 ir aktivēti, kā arī nav skaidrs, cik izteiktas ir iekaisīgās pārmaiņas centrālajos un perifērajos elpceļos asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.

2.11. T regulatoro limfocītu nozīme HOPS patoģenēzē

Svešie antigēni, tajā skaitā, alergēni un dažādi patogēni, kas nonāk organismā, tiek uztverti ar antigēnprezentējošām šūnām, kas pārstrādā antigēnus un prezentē to peptīdus kompleksā ar galveno audu saderības kompleksu-2 (MHC2).

CD4 T helpera (Th) limfocīti tiek aktivēti, saistoties T šūnu receptoram ar MHC2 kompleksu uz antigēnprezentējošo šūnu virsmas aktivētājmolekulu klātbūtnē (piemēram, CD28/B7). Kad Th tiek aktivēti, tie iniciē antigēnspecifisku šūnu un humorālo imūnu atbildi (Coyle, 2004; Larche, 2003; Romagnani, 2000).

Th1 un Th2 šūnu inhibējošā efekta atklāšana, kā arī disbalanss starp dažādām Th populācijām, tiek uzskatīts par vienu no autoimūno slimību patoģenētiskajiem pamatiem.

Th1 šūnas un to izdalītie citokīni (piemēram, IFN- γ) raksturīgi ne tikai cukura diabētam, Krona slimībai, bet arī atopiskam dermatītam, astmai un alergiskai sensibilizācijai.

Savukārt, Th2 limfocīti ir saistīti ar parazitārām slimībām, astmu un alergisku rinītu (Mosmann, 1989; Hapsenberg, 1992; Romagnani, 1992).

Apkopojot iepriekš teikto, jāsecina, ka eksistē citi regulējoši mehānismi, kas varētu kontrolēt Th šūnu reakcijas.

T regulatorie limfocīti (Treg) tiek uzskatīti par galvenajām šūnām T limfocītu funkcijas kontrolē. Ir vairākas Treg šūnu populācijas-naturālie (nTreg) un adaptīvie (aTreg) T regulatorie limfocīti.

3. tabula. Galvenās CD4+ T regulatoro šūnu īpašības, pamatojoties uz to virsmas receptoriem, sekretētiem citokīniem un inhibējošo ietekmi (angl. The peculiarities of CD4+ T regulatory cells).

nTreg	Th3	Tr1
Veidojas tīmusā	Šķīstošais/membrānu TGF-β	Šķīstošais IL-10
CD4+CD25 ^{hi} CD45RO GITR+CTLA+CD103+ FOXP3+	Veidojas perifērijā Dažāda CD25 ekspresija	Veidojas perifērijā
Aizsargā pret autoimūnām reakcijām	Nomāc Th1 un Th2 reakcijas	Dažāda CD25 ekspresija Nomāc Th1 un Th2 reakcijas
Sastāda 5-10% no CD4+ šūnām		

2.11.1. Naturālās T regulatorās šūnas

CD4+CD25+ nTreg veidojas tīmusā un nonāk perifērajā asins cirkulācijā vai limfoidālajos audos, kur tie sastāda 5-10% no visas CD4+ šūnu populācijas. Savukārt, sarkanajās kaulu smadzenēs gan cilvēkiem, gan pelēm tie sastāda vairāk nekā 20% no CD4 T šūnu populācijas (Maloy, 2001; Shevach, 2002).

Eksperimentos ar dzīvniekiem parādīts, ka pasīva nTreg ievadīšana sekmēja autoimūnā diabēta, zarnu iekaisuma slimību nomākšanu, kā arī novērsa transplantāta atgrūšanas reakciju (Bluestone, 2003; Fehervani, 2004; Thornton, 2000).

nTreg ekspresē α/β tipa TCR un tos var aktivēt anti-CD3. nTreg TCR piemīt augsta saistīšanās spēja pret pašu peptīdiem, kas daļēji izskaidro faktu, ka šīs šūnas ekspresē CD25. Kaut gan nav precīzi zināma šo pašpeptīdu daba.

Ir parādīts, ka nTreg var arī veidoties no parastām CD4+ T šūnām, pēc kontakta ar antigēnu vai ilglaicīgas transformējošā augšanas faktora vai glikokortikoīdu subkutānas ievadīšanas (Fantini, 2004).

Pētījumi ar cilvēka CD4+CD25+ šūnām apstiprina rezultātus, ko ieguva eksperimentos ar pelēm. Cilvēka CD4+CD25+ nTreg šūnām piemīt vāja proliferācijas spēja, pat pēc

stimulācijas ar anti CD3 IL-2 klātbūtnē. Tajā pašā laikā, šīs šūnas producē IL-10 un TGF- β mazās koncentrācijās (Foussat, 2003; Zheng, 2004).

In vitro nTreg nomāc adaptīvo T-šūnu atkarīgo imūno atbildi, ietekmējot tikai T šūnas un T šūnu/antigēnpresentējošo šūnu kontaktu. Šī mehānisma molekulārais pamats vēl pilnībā nav skaidrs. Tajā ir iesaistītas tādas šūnas virsmas molekulas kā CTLA-4, Notch-3 un LAG-3, kā arī intracelulārais enzīms - hema-oksigenāze (Anastasi, 2003; Birebent, 2004; Munn, 2004; Pae, 2003).

Interesanti, ka CTLA-4 kontaktu ar B7-1 vai B7-2 uz dendrītisko šūnu virsmas novēro tikai enzīma indolamīna-2,3-dioksigenāzes (IDO) klātbūtnē (Grohmann, 2003).

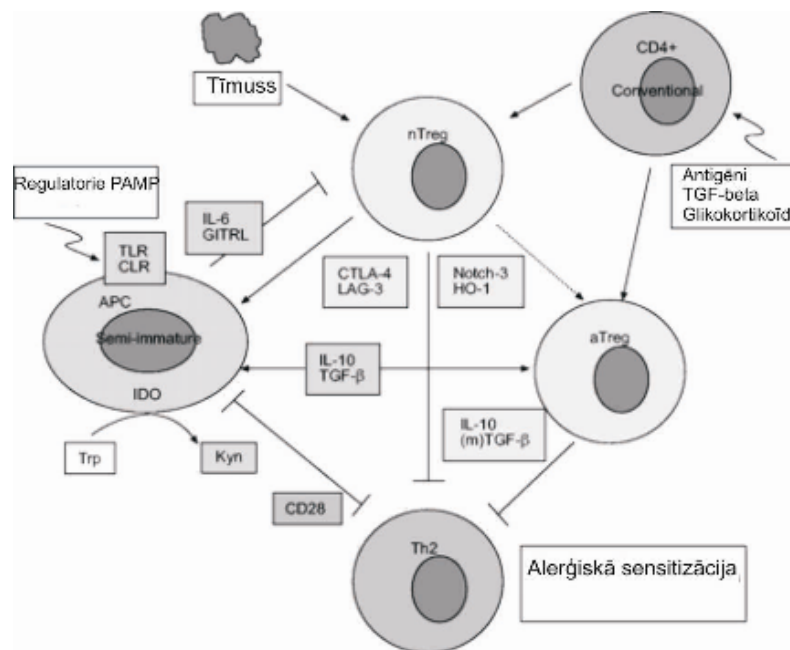
Indolamīna-2,3-dioksigenāze ir koncentrācijas atkarīgs enzīms, kurš ir iesaistīts triptofāna transformācijā, kunurenīna reakcijā, kā arī citās metabolisma reakcijās. Tā arī var sekmēt T šūnu nomākšanu, samazinot tajās triptofāna koncentrāciju.

Turklāt, šim enzīmam arī piemīt antiproliferatīvs un apoptotisks efekts, kas ir saistīts ar aktīviem metabolītiem.

Pretējs efekts ir dendrītisko šūnu B7 molekulas kontaktam ar CD-28, kas noved pie T šūnu stimulācijas un IL-6 produkcijas, kas nomāc indolamīna-2,3-dioksigenāzi (Logue, 2004).

nTreg arī ekspresē vairākus virsmas marķierus-CTLA-4, CD45R^{low}/CD45RO (peles/cilvēki), CD38, CD62L, glikokortikoīdu stimulētus tumoru nekrozes faktora (TNF) receptorus (GITR, ko vēl dēvē par TNFRSF18) un neiropilīnu, kurš vienīgais nomāc parastu T šūnu aktivitāti (Baecher-Allan, 2001; Bruder, 2004).

Spriežot pēc integrīnu ekspresijas, nTreg var iedalīt subpopulācijās. α E β 7 (CD103) ekspresē nTreg ar augsto nomākšanas spēju. Tā kā α E β 7 spēj veidot kontaktu ar epitēliālo šūnu E-kadherīnu, un šī populācija ir uzskatāma par gļotādu specifisko populāciju (Lehmann, 2002). *Stassen et al.* aprakstīja α 4 β 7⁺ un α 4 β 1⁺ nTreg subpopulācijas, kas attiecīgi stimulē Th1 un Th3 (Stassen, 2004).



11. attēls. nTreg nomācošie efekti uz T efektora šūnām (angl. The suppressive effects of nTreg on Tcell population). Dabiskās Treg šūnas (nTreg) pārsvarā veidojas tīmusā, bet specifisku signālu ietekmē, arī var veidoties no CD4+ T limfocītiem. nTreg piedalās Th2 šūnu nomākšanā, kur svarīga nozīme ir vairāku molekulu mijiedarbībai-CTLA-4, Notch-3, CD28 un LAG-3, kā arī enzīmam hēma oksigenāzei-1 (HO-1). nTreg nomāc GITRL un IL-6, ko ekspresē dendrītiskās šūnas (antigēnprezentējošās šūnas). Nobriedušās vai pilnībā nenobriedušās antigēnprezentējošās šūnas sintezē IL-10 un transformējošu augšanas faktoru β (TGF- β), kuri stimulē Tr1 un Th3 nobriešanu. Šo citokīnu sintēzi stimulē t.s. „patogēnu asociētie molekulārie regulējošā tipa signāli” (PAMP). Trp-triptofāns; kyn-kinurenīns; TLR-Toll līdzīgie receptori; CLR-C-tipa lektīna receptors; Ag-antigēns.

2.11.2. FOXP3 un naturālie T regulatorie limfocīti

Vairāku specifisku transkripcijas faktoru ekspresija ir nozīmīga Th limfocītu diferenciācijā. Stap šiem transkripcijas faktoriem būtiska nozīme ir T-beta (Th1 limfocītu diferenciācijā) un GATA-3 (Th2 limfocītu diferenciācijā) [Wahl, 2004; Hori, 2003].

Nesen tika parādīts, ka FOXP3 (forkhead box P3 gēns, „dakšveida, spārnains gēns”) gēna ekspresija ir specifisks Treg limfocītu marķieris. Turklāt, tā ekspresija ir svarīga ne tikai Treg diferenciācijai, bet arī tās funkcijai.

Ekspimentālie dati liecina, ka FOXP3 negatīvām pelēm attīstās letālas autoimūnas slimības (Khattri, 2003). FOXP3 ekspresē gan naturālie, gan adaptīvie Treg.

Pētījumu dati liecina, ka tieši FOXP3 ir liela nozīme perifēros audos adaptīvu limfocītu funkcijā (Yagi, 2004).

2.11.3. Adaptīvie T regulatorie limfocīti

Adaptīvie T regulatorie limfocīti veidojas perifērajos audos no naturālajiem Treg limfocītiem pēc antigēna prezentācijas un T limfocītu aktivācijas (De Yong, 2005).

Adaptīvas T regulatorās šūnas iedala divās grupās-Tr1 un Th3, kas ražo atbilstoši - IL-10 un TGF- β (Cottrez, 2004). Šīs vielas nomāc MHC2 un dažādu adhēzijas molekulu ekspresiju. Turklāt, TGF- β nomāc neaktivētu T limfocītu proliferāciju un aktivitāti un var veicināt IL-10 sekrēciju limfocītos, bet IL-10 sekmē TGF- β receptoru ekspresiju aktivētos limfocītos ar sekojošu to nomākšanu (Kitani, 2003). Tādējādi šie abi citokīni-IL10 un TGF- β , darbojas sinerģiski.

Visi adaptīvie T limfocīti ekspresē CD25 molekulas, bet Tr vēl raksturīga IL-5, IFN- γ un TGF- β , bet Th3 papildus ekspresē IL-4 un IL-10 (Oosterhout, 2005).

Mūsu iepriekšējie pētījumi liecina, ka Treg limfocītu skaits samazinās aukslēju mandeļu limfoidālajos audos pacientiem ar hronisku dekompensētu tonsilītu, kas korelē ar pastiprinātu audu kolonizāciju ar patogēnu mikrofloru (Isajevs, 2007; Isajevs, 2006).

2.11.4. Dendrītisko šūnu nozīme adaptīvu T limfocītu veidošanā

Dendrītiskajām šūnām ir svarīga nozīme adaptīvo Treg limfocītu veidošanā (Kapsenberg, 2003; Lambrecht, 2003).

Īsumā, naivās dendrītiskās šūnas (tās šūnas, kas vēl nav saskārušās ar antigēnu) perifērajos audos uzņem antigēnus un/vai patogēnus fagocitozes, endocitozes vai pinocitozes ceļā un aktivējas pēc kontakta ar tā saucamajiem „bīstamajiem signāliem” (De Jong, 2005, Matzinger, 2002).

Šos signālus var producēt pats antigēns vai endogēnie mediatori, kuri veidojas vai pastāvīgi atrodas audu mikrovidē.

Mikrobu patogēni satur ligandus (patogēnu-asociēts molekulārais komplekss, PAMP), ko atpazīst „kompleksu atpazīstošs receptors”. Šīs saimes pārstāvji ir *Toll*-līdzīgo receptoru saime, un C-tipa lektīna receptori (Pulendram, 2001; van Kooyk, 2004; Wagner, 2001).

Baktērijām ir daudz PAMP - tie var būt gan šūnu sienas komponenti (lipopolisaharīdi, lipoproteīni, peptīdoglikāni), gan DNS (Wagner, 2001). Pēc Toll receptoru aktivācijas tiek stimulēta NF- κ B ekspresija. Dendrītisko šūnu nobriešana rakturojas ar paaugstinātu *MHCII* un tādu molekulu kā B7-1, B7-2 un CD40 ekspresiju un iekaisumu stimulējošo citokīnu sekrēciju (Pasare, 2004; Wagner, 2001).

Tolerogēnās dendrītiskās šūnas parasti ir pilnībā nenobriedušas šūnas ar paaugstinātu *MHCII* un B7-2 ekspresiju, bet zemu CD40 ekspresiju un tās neražo iekaisumu stimulējošos citokīnus-IL-6 un TNF- α . Atkārtotā T-šūnu stimulācija sekmē IL-10 sekrēciju (Lutz, 2002; Dhodapkar, 2001).

Vitamīna D3 bioloģiski aktīvā forma - (1,25(OH)₂VITD3) un glikokortikoīdi stimulē Tr1-līdzīgas šūnas *in vitro* un tolerances attīstību transplantācijas un autoimūnu saslimšanu modelī pelēm (Dong, 2003; Gregori, 2001).

Tr1 un Th3 šūnu stimulācija ir saistīta ar IL-10 un TGF- β , ko sekretē pilnībā nenobriedušās dendrītiskās šūnas.

Vairāki patogēni, tajā skaitā, vīrusi, parazīti, sēnes un baktērijas, inducē vai nu abu šo citokīnu, vai kādu vienu no tiem, tādējādi stimulējot aTreg (Kapsenberg, 2003).

Lokālā mikrovide arī ietekmē tolerogēnu dendrītisko šūnu attīstību un tālāko aTreg veidošanos, kas vērojama gļotādu tolerances attīstības laikā.

Tolerance, ko izraisa intranazālā ovalbumīna ievadīšana, sekmē dendrītisko šūnu parādīšanos plaušās, kas paaugstina Tr1 skaitu *ex vivo* (Oosterhout, 2005). Iespējams, ka šo reakciju stimulē IL-10.

Tolerance, ko izraisa intragastrālā ovalbumīna ievadīšana, tā saucamā „orālā tolerance”, ir saistīta ar TGF- β , kas stimulē Th3 (Oosterhout, 2005).

Viens no iespējamajiem molekulārajiem mehānismiem var būt saistīts ar NF- κ B nomākšanu epiteliālajās šūnās, ko izraisa komensālās baktērijas, kas noved pie pretiekaisuma tolerogēnās vides attīstības (Beg, 2004; Steinman, 2003).

2.11.5. T regulatorās šūnas un astma

Sensitizācija pret vides alergēniem izpaužas jau agrīnā bērnībā vai pat pirms dzemdībām, bet tās secīga progresija ar pāreju atopiskā astmā var neizpausties vairākus gadus (Holt, 2000).

Šis fakts ļāva izvirzīt hipotēzi par to, ka negatīvi regulējošās Th1-atkarīgās imūnatbildes indukcija pirmajos dzīves gados var novērst alergisko sensitizāciju un pāreju atopiskajā astmā (Holt, 2003).

nTreg aktivitāti novēro arī nabas saites asinīs, un, iespējams, tai ir imūnregulējošā nozīme intrauterīnajā dzīvē (Holt, 2003).

Thorton et al. nesēn aprakstīja, ka nabas saites asinīs T šūnu kultūras alergēnu klātbūtnē sekmēja CD4+CD25+ Treg šūnu skaita palielināšanos (Thornton, 2004).

Šis pieaugums nebija saistīts ar nTreg proliferāciju, bet ar parasto T šūnu apoptozi.

Bellinghausen et al. konstatēja līdzīgu nTreg aktivitāti perifērajās asinīs bērzu putekļu izraisīta rinīta pacientiem (Bellinghausen, 2003). Šīm šūnām bija raksturīga vāja proliferācijas spēja, tās gandrīz neproducēja citokīnus un nomāca Th1 un Th2 proliferāciju. Turklāt, IL-10, TGF- β vai CTLA-4 nomākšana bija neatgriezeniska, bet IL-2 izraisīta inhibēšana bija atgriezeniska (Ling, 2004). Šis fakts ir saskaņā ar nTreg funkciju.

Turpretim, *Ling et al.* pierādīja, ka nTreg pārstādīšana no atopiskiem donoriem noveda pie mazāk intensīvas autologu CD4+CD25+ šūnu proliferācijas un IL-5 sekrēcijas nomākšanas (Ling, 2004).

Pedējos pētījumos tika apstiprināts, ka nTreg veidojas no izolētām CD4+CD25+ šūnām, kas balstās uz FOXP3 mRNS ekspresiju (Bellinghausen, 2003; Ling, 2004).

Karlsson et al., pētot bērnus ar alergiju pret govju pienu, novēroja, ka alergiskiem bērniem asinīs ir palielināts CD4+CD25+ šūnu skaits, pretstatā veselīgiem bērniem.

Šo šūnu paaugstināts skaits *in vitro* bija saistīts ar samazinātu T-šūnu atbildi pret ēdiena alergēniem (Karlsson, 2004).

Šīm šūnām ir raksturīga augsta nomākšanas spēja, ko apstiprina fakts, ka, ja šīs šūnas ir nomāktas, tad strauji pieaug (5 reizes) proliferatīvā T-šūnu atbilde uz barības alergēniem.

Šāda T-šūnu nomākšana bija saistīta ar starpšūnu kontaktu pieaugumu (Karlsson, 2004). Tomēr nevar arī pilnīgi izslēgt citokīnu nomākšanas efektu.

Mastumoto et al., salīdzinot vidēji smagu un smagu astmu, pierādīja, ka IL-10 producējošās T-šūnas ir saistītas ar astmas smaguma pakāpi (Matsumoto, 2004).

Izmantojot plūsmas citometrijas metodi, tika noteikts IL-10 producējošo T-šūnu skaits. Pēc anti-CD3/anti-CD28 stimulācijas, T šūnu skaits bija zemāks smagās astmas pacientu grupā.

Akdis et al. novēroja precīzu līdzsvaru starp Tr1 un Th2 parādīšanās biežumu (Akdis, 2004). Tr1 šūnu populācija bija dominējošā veseliem indivīdiem, vienlaikus IL-4 producējošo T šūnu skaits bija palielināts alergiskajiem indivīdiem.

Tr1 nomākšana *in vitro* saistīta ar paaugstinātu alergēna stimulētās Th2 aktivēšanos.

Tajā pašā laikā, nomācošs Tr1 efekts *in vitro* tika saistīts ar IL-10 un TGF- β sintēzi (Akdis, 2004).

2.11.6. Glikokortikoīdi un T regulatorās šūnas

Ir novērots, ka CD4+CD25+ Treg šūnu inkubācija ar glikokortikoīdiem paaugstina IL-10 ekspresiju un antiproliferatīvo ietekmi uz CD4+CD25+ T šūnām (Dao Nguyen, 2004). Tādējādi, nTreg, izdalot IL-10, modulē glikokortikoīdu efektu.

Karagiannidis et al. pierādīja, ka glikokortikoīdi arī var ietekmēt Tr1/nTreg attīstību *in vivo*. Tika parādīts, ka inhalēto vai sistēmisko glikokortikoīdu ietekmē astmas pacientiem paaugstinājās FOXP3 un IL-10 mRNS līmenis perifērajās asinīs (Karagiannidis, 2004).

2.11.7. aTreg un gļotādu tolerance

Pelēm primārā predispozīcija pret modulēto antigēnu-ovalbumīnu, kas nokļūst elpceļu gļotādā inhalācijas vai intranazālās injekcijas rezultātā, inducē tolerances attīstību pret IgE (Akbari, 2003).

Šādas tolerances attīstību stimulē Treg. Pēc primārās ovalbumīna predispozīcijas novēroja aktīvo Tr1 šūnu proliferāciju, ko izraisīja IL-10 producējošās dendrītiskās šūnas un Th3/nTreg, kas producē TGF- β (Ostroukhova, 2004).

Cates et al. parādīja, ka alergiskā sensitizācija, ko izraisa putekļu inhalācija, ir modulēta ar glanulocītu makrofāgu-koloniju stimulējošo faktoru (GM-CSF) [Cates, 2003, Cates, 2004]. Turklāt, tika parādīts, ka adenovīrusa GM-CSF gēna pārnesē stimulē GM-CSF veidošanos epitēlijā šūnās. (Cates, 2004).

2.11.8. T regulatorie limfocīti un higiēnas hipotēze

Higiēnas hipotēze norāda, ka pastāv saistība starp predispozīciju pret mikrobiem agrīnās bērnības laikā un Th2 šūnu skaitu (Yazdanbakhsh, 2002). Protams, nevar pilnībā izslēgt Th1 reaktivitātes īpatnības, kuras ietekmē bakteriālā infekcija. Tas, savukārt, var nomākt Th2 stimulētās alergiskās reakcijas.

Taču ir novērots, ka, jo vairāk ir palielināts Th1 skaits, jo vairāk pieaug Th2 skaits (Bach, 2002).

Tādējādi var secināt, ka alergisko un autoimūno slimību laikā šūnu skaita palielināšanās ir saistīta ar Th1 imūnregulācijas samazināšanos.

Svarīga nozīme ir mikroorganismiem, kas var ietekmēt Treg populāciju.

Pamatā tas ir saistīts ar PAMP stimulētu tolerogēno dendrītisko šūnu attīstību, kā rezultātā pieaug IL-10 un TGF- β sekrēcija šajās šūnās (Kapsenberg, 2003).

Treg-atkarīga antigēna izdzīvošana nav obligāti kaitīga organismam, tā noved pie stabilas imunitātes attīstības, turpretim, pilnīga šī efekta neitralizācija sekmē imunitātes nomākšanu (Belkaid, 2002).

Tādējādi, Treg stimulēta zemas patogēna koncentrācijas uzturēšana ļauj stabili noturēt šo šūnu aktivitātes līmeni.

Tas nomāc arī nevēlamas alergiskas un autoimūnas reakcijas, pēc tā saucamā dubultaizsardzības mehānisma principa, kas balstās uz nTreg un IL-10 atkarīgu imūnreakciju uzturēšanu.

Jāpiebilst, ka paaugstinātu Treg skaitu organismā var uzturēt zarnu mikroflora.

Šo faktu apstiprina tas, ka peļu Treg, izolētas no zarnu *lamina propria* mezenteriālajiem limfmezgliem un perifērajām asinīm, neietekmē resnās vai tievās zarnas saturu, turpretim, Treg šūnu samazināšanās izraisa pastiprinātu zarnu mikrofloras savairošanos (Von Herrath, 2003; Gad, 2004).

Laktobaktērijām ir svarīga nozīme Treg atbildes uzturēšanā (Hansen, 2000; Kalliomaki, 2003; Zuany-Amorim, 2002).

2.11.9. T regulatoro šūnu nozīme HOPS patoģenēzē

Ļoti maz ir zināms par Treg limfocītu nozīmi HOPS etiopatogēnēzē. Pēdējā laikā vairākos pētījumos uzsvērts, ka HOPS patoģenēzē ir iesaistītas autoimūnās reakcijas.

Autoimunitātes hipotēzi apstiprina vairāki pētījumi, kuros parādītās antivielas pret plaušu audu struktūrām-anti-elastīna un antiepitēlija antivielas (Lee, 2007; Feghali, 2008). Antiepitēliālās antivielas ir mērķētas pret alveolāro epitēliju un endotēliju un veicina ar antivielām atkarīgu šūnu citotoksicitāti.

Turklāt, ir konstatēts, ka pelēm, kas tika imunizētas ar ksenogēnām endotēliālajām šūnām, rodas antivielas pret šīm šūnām un attīstās emfizēma.

Šī imunizācija izraisa alveolocītu apoptozi un matricas metaloproteināžu aktivāciju (MMP-2 un MMP-9). Anti-endotēliālās antivielas stimulē endotēlija šūnu apoptozi *in vitro* un emfizēmas attīstību. Šis novērojums uzsver, ka plaušu emfizēma var attīstīties imūno reakciju rezultātā (Taraseviciene-Stewart, 2005).

Elpceļu epitēlija šūnām ir svarīga nozīme imunoloģisko reakciju uzturēšanā, veidojot tā saucamos bīstamos signālus, ko savā teorijā aprakstīja *Mantzinger* (Matzinger, 2002). Saskaņā ar šo teoriju, -tabakas dūmos esošie brīvie radikāļi bojā plaušu audus, un no tiem, šūnu nekrozes un apoptozes rezultātā, veidojas jauni un modificēti proteīni (piemēram, desmozīni), kurus atpazīst imunkompetentās šūnas.

Līdzīgi *Lee et al.* savā pētījumā parādīja, ka emfizēmai ir raksturīga Th1 šūnu aktīvā atbilde, un pacientiem ar emfizēmu asinīs var noteikt anti-elastīna antivielas (Lee, 2007).

Di Stefano et al. piedāvāja T šūnu aktivācijas modeli (Di Stefano, 2004). Pēc antigēna nonākšanas organismā to atpazīst dendrītiskās šūnas, fagocītē un prezentē uz savas virsmas. Tad notiek T šūnu receptora un MHC2 mijiedarbība, naīvie T limfocīti aktivējas, sekretē IL-2 un pēc dažām dienām migrē no limfmezgla uz plaušām.

Ir zināms, ka Th1 šūnas sintezē interleikīnu-2 (IL-2) un interferonu- γ (IFN- γ), nosakot klasiskās imūnās atbildes reakcijas pret intracelulāriem organismiem un vēlīnā tipa alergiskās reakcijas.

Turpretī, Th2 šūnas alergēnu ietekmē izdala IL-4 un IL-5, kas, savukārt, veicina alergiska iekaisuma attīstību un IgE sintēzi.

Diferencētas imūnās sistēmas gadījumā, atopiskam indivīdam atbildes tips atkarīgs no antigēna, un viens no imūnās atbildes tiptiem neaizkavē otra tipa imūnās reakcijas attīstību. Th2 šūnas, savukārt, izdala bioloģiski aktīvas vielas, kas nodrošina turpmāko alergiskās reakcijas kaskādes norisi.

Th2 limfocīti izdala granulocītu makrofāgu kolonija stimulējošo faktoru (GM-CSF), IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, tumoru nekrozes faktoru- α (TNF- α), kas kontrolē turpmāko alergiskā iekaisuma norisi. IL-4 un IL-13, galvenokārt, iedarbojoties uz B-limfocītiem, veicina IgE sintēzi šajās šūnās.

Savukārt, GM-CSF un IL-5 veicina iekaisuma šūnu, tajā skaitā, eozinofilo leukocītu diferencēšanos, aktivāciju un apoptozes aizkavēšanos (Chung, 2008).

Plaušās antigēnpresentējošās šūnas-makrofāgi un endoteliocīti saistās ar TCR un sekmē IL-12 sintēzi un sekojošu STAT-4 un IFN γ aktivāciju T limfocītos (Di Stefano, 2004).

Di Stefano et al. parādīja, ka HOPS pacientiem STAT-4 un IFN γ ir aktivēts centrālajos elpceļos (Di Stefano, 2004).

Pēc CD4+ T limfocītu stimulācijas aktivējas arī CD8+ T limfocīti, turklāt, to aktivācijai ir nepieciešama mijiedarbība ar CD4+ T limfocītiem.

Ir arī iespējama paralēla dendrītisko šūnu antigēna prezentācija gan CD4+, gan CD8+ T limfocītiem. Antigēna apstrādē nozīme ir karstuma šoka proteīniem.

Savukārt, CD8+ T limfocītus var aktivēt antigēns, kompleksā ar MHC1 molekulām, iesaistot proteosomas ceļu (Cosio, 2004).

Turklāt, pēc CD8+ T limfocītu aktivācijas, to klonālā ekspansija notiek intensīvāk, kas izskaidro faktu, kāpēc CD8+ T limfocītu plaušu audos ir vairāk nekā CD4+ T limfocītu (Agusti, 2003; Cosio, 2004).

Līdz šim ir maz pētīta T regulatoro limfocītu nozīme HOPS patoģenēzē.

Tikai 2007. gadā *Lee et al.* publicēja datus par to, ka pacientiem ar emfizēmu novēro samazinātu CD4+CD25+ Treg skaitu, kas korelē ar FOXP3 mRNS ekspresiju plaušu audos (Lee, 2007).

Smyth et al. parādīja, ka BAL šķidrumā CD4+CD25+ Treg ir palielināti skaitā gan asimptomātiskajiem smēķētājiem, gan smēķētājiem ar HOPS (Smyth, 2007).

Turpretim, *Barcelo et al.* novēroja, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem Treg BAL šķidrumā ir palielinātā skaitā, bet HOPS pacientiem samazināti skaitā (Barcelo, 2008).

Šie pretrunīgie pētījuma dati, mūsaprāt, varētu būt skaidrojami ar atšķirīgu Treg izplatīšanos centrālajos un perifērajos elpceļos. Turklāt, nevar izslēgt smēķēšanas ilguma ietekmi uz Treg populāciju. Līdz šim netika veikti pētījumi, kuros būtu analizēts T regulatoro limfocītu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.

2.12. Darba aktualitāte, novitāte un hipotēze

Kopsavilkumā varam secināt, ka

- 1) HOPS patogēnēzē ir iesaistīti vairāki mehānismi, kas rada iekaisīgas izmaiņas centrālajos un perifērajos elpceļos un plaušu pārstrukturēšanos;
- 2) Iekaisuma šūnām un no tām izdalītiem iekaisuma citokīniem, adhēzijas molekulām un hemokīniem ir vadoša nozīme iekaisuma uzturēšanā;
- 3) Nukleārais faktors- κ B (NF- κ B) ir svarīgs transkripcijas faktors, kas regulē iekaisuma citokīnu, hemokīnu un adhēzijas molekulu sintēzi.
- 4) Histona deacetilāzes 2.subtips (HDAC2) ir svarīgs enzīms, kas regulē NF- κ B aktivitāti
- 5) Iekaisuma reakciju regulācijā nozīme varētu būt T regulatorajiem limfocītiem, kas uztur imunoloģisko toleranci un nomāc pārmērīgas iekaisuma atbildes.

Tomēr, pētot pasaules literatūru, joprojām ir maz datu par to, vai iekaisuma reakcijas centrālajos un perifērajos elpceļos ir vienādas asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem. Turklāt, joprojām ir maz izpētīta T regulatoro limfocītu nozīme HOPS patogēnēzē un nav skaidra to izplatība centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.

Līdz ar to **darba aktualitāte** ir iekaisīgo pārmaiņu salīdzinājums dažāda kalibra elpceļos, respektīvi, centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.

Turklāt darba **novitāte** ir fakta konstatācija, ka iekaisuma process perifērajos elpceļos HOPS gadījumā attīstās neatkarīgi no iekaisuma procesa centrālajos elpceļos, un tā attīstība ir saistīta ar perifēro imūno procesu regulācijas traucējumiem, ko izraisa nomākta T regulatoro limfocītu funkcija.

Darba hipotēze jau minēta iepriekš.

3. DARBA MĒRĶIS

Darba mērķis ir novērtēt, vai pastāv atšķirības starp iekaisuma procesa mehānismiem centrālajos un perifērajos elpceļos nesmeķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un vidēji smagas pakāpes HOPS pacientiem, kā arī izvirzīt iespējamus kritērijus HOPS diagnostikā, ārstēšanas efekta novērtēšanā un prognozē.

4. DARBA UZDEVUMI

1. Kvantitatīvi novērtēt iekaisuma šūnu infiltrāciju centrālajos un perifērajos elpceļos nesmeķētājiem, smēķētājiem ar normālu plaušu ventilācijas funkciju (asimptomātiskie smēķētāji) un HOPS pacientiem;
2. Noskaidrot, vai iekaisīgās izmaiņas asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem atšķiras centrālajos un perifērajos elpceļos;
3. Noteikt, kurās šūnās centrālajos un perifērajos elpceļos nukleārais faktors- κ Bp65 (NF- κ Bp65) un 2. apakštipa histonu deacetilāze (HDAC2) ir aktivēta nesmeķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem;
4. Novērtēt T regulatoro limfocītu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos nesmeķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem;
5. Izvērtēt iespējamās likumsakarības starp NF- κ Bp65 un HDAC2 pozitīvām šūnām, CD8 T-limfocītiem, makrofāgiem, neitrofīlajiem leukocītiem, kā arī T regulatorajiem limfocītiem un elpošanas funkcionālajiem rādītājiem, izsmēķētājiem pakgadiem. Noteikt iespējamus kritērijus HOPS diagnostikā, ārstēšanas efekta novērtēšanā un prognozē.

5. PACIENTU RAKSTUROJUMS UN METODEDES

5.1. Pacientu izvēle

Atļauja veikt pētījumu tika saņemta P. Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas ētikas komisijā. Pētījums veikts atbilstoši *Helsinki* deklarācijai. Visi pacienti parakstījās, ka piekrīt pētījumam.

Pētījumā tika izmantots histoloģiskais materiāls, ko ieguva no 72 pacientiem, kuriem tika operēts nesīkšūnu plaušu vēzis laika posmā no 2006. gada janvāra līdz 2008. gada martam. Izmeklējamās personas tika iedalītas trijās grupās:

- 1) nesmēķētāji ar normālu plaušu ventilācijas funkciju ($n = 19$; $FEV_1 > 80\%$; $FEV_1/VC > 70\%$);
- 2) smēķētāji ar normālu plaušu ventilācijas funkciju-asimptomātiskie smēķētāji ($n = 28$; $FEV_1 > 80\%$; $FEV_1/VC > 70\%$);
- 3) smēķētāji ar vidēji smagu HOPS- ($n = 25$; $50\% < FEV_1 < 80\%$; $FEV_1/VC < 70\%$).

HOPS diagnoze tika noteikta, pamatojoties uz *GOLD* kritērijiem (Pauwels, 2001). Nevienai no pētījumā iekļautajām personām mēneša laikā no pētījuma sākuma nebija slimības paasinājuma, un neviens nelietoja glikokortikoidus vai teofilīnu.

Visiem pacientiem tika noteikta plaušu ventilācijas funkcija, izmantojot *Jaeger* firmas spiromātru *Master Screen*. Tika novērtēta VC, FEV_1 , $FEV_1/VC\%$ pirms un 15 minūtes pēc β_2 agonista (400 μg salbutamola) inhalācijas un aprēķināta $FEV_1\%$ reversibilitāte. $FEV_1\%$ reversibilitāti aprēķināja kā starpību starp $FEV_1\%$ 15 minūtes pēc β_2 agonista inhalācijas un $FEV_1\%$ pirms inhalācijas.

5.2. Histoloģiskā un imūnhistoķīmiskā izmeklēšana

Audu paraugi no operācijas materiāla (lobektomija vai segmentektomija) tika ņemti pēc iespējas tālāk no audzēja audiem, tuvu rezekcijas līnijām, kur makroskopiski audzēju

nekonstatēja. Jāatzīmē, ka plaušu operācijas materiāls, ko iegūst no pacientiem ar plaušu audzēju, ir vienīgais avots vienlaicīgi centrālo un perifēro elpceļu izmeklēšanai.

Lai novērtētu centrālos elpceļus, no iegūtā operācijas materiāla izmeklējam segmentāros bronhus, bet perifēro elpceļu analīzei izmeklējam subpleirālu plaušu audu fragmentu. Centrālie elpceļi tika definēti kā elpceļi, kuru diametrs ir lielāks par 2 mm un kuriem ir zemgļotādas dziedzeri un skrimslis. Savukārt perifērie elpceļi tika definēti kā elpceļi, kuru diametrs ir mazāks par 2 mm un kuriem nav skrimšļa.

Preparāti tika krāsoti ar hematoksilīnu eozīnu, lai novērtētu elpceļu histopatoloģiskās pārmaiņas un noteiktu elpceļu diametru. Ja histoloģiskajā paraugā tika atrastas audzēja šūnas, šo pacientu izslēdza no pētījuma.

Visiem vidēji smagās pakāpes HOPS pacientiem plaušās novērojām HOPS raksturīgās pazīmes - plaušu emfizēmu, fibrozi, kā arī perifēro elpceļu fibrozi un kausveida glandulocītu hiperplāziju.

Histoloģiskā materiāla pagatavošanai audi tika fiksēti 10% formalīnā 48 stundas, pēc tam atūdeņoti un ievietoti parafīnā. No blokiem tika pagatavoti 4 µm biezi griezumumi un imūnhistoķīmiski izmeklēti. Preparāti tika deparafinizēti (ksilols –15 minūtes; 96° spirts – 6 minūtes, 70° spirts – 6 minūtes, destilēts ūdens – 1 minūti). Antigēna demaskēšanai tika izmantota sakarsēšanas metode mikrovilņu krāsnī. Preparāti tika ievietoti citrāta buferšķīduma vannā, kura pH = 6,2, un inkubēti 30 minūtes *Electrolux* mikrovilņu krāsnī pie jaudas 300 W. Savukārt, identificējot CD8 limfocītus, preparāti tika inkubēti buferšķīduma vannā, kura pH = 9,0. HDAC2 gadījumā antigēna demaskēšanai izmantoja 15 minūšu ilgu preparātu apstrādi ar tripsīnu 37 °C temperatūrā. Pēc tam tika veikta imūnhistoķīmiskā krāsošana, lietojot biotīna avidīna metodi ar DAKO firmas *LSAB (labeled streptavidin biotin)* kitu. Visas reakcijas tika veiktas *Shandon* mitrajā kamerā istabas temperatūrā. Preparāti tika inkubēti 10 minūtes peroksidāzes bloķētājreaģenta klātbūtnē un skaloti TBS buferšķīdumā (0,05 mmol/l Tris HCL, 0,15 mmol/l NaCl, pH = 7,6), pēc tam inkubēti ar primāro antivielu (sk. 1. tabulu).

Inkubācija ar NF-κBp65 un HDAC2 antivielu notika ledusskapī pie +2 °C temperatūrā 18 stundas, bet inkubācija ar FOXP3 (T regulatoro šūnu marķieris), CD8, CD68 un neitrofilo leikocītu elastāzi notika 1stundu istabas temperatūrā.



12.attēls. Mitrā kamera imūnhistoķīmisko reakciju veikšanai (angl. Humidity chamber for immunohistochemical staining).

4.tabula. Darbā izmantotas primārās antivielas (angl. Used primary antibodies).

Antiviela	Ražotājfirma	Antivielas titrs	Inkubācijas laiks
NF-κBp65, truša poliklonālā, ab 7970	Abcam	1:1000	18 stundas
HDAC2, truša poliklonālā	Abcam	gatava lietošanai	18 stundas
FOXP3, peles monoklonālā, 221D/D3 klons	Serotec	1:100	1 stunda
CD68, peles monoklonālā, klons PG-M1, M0876	DAKO	1:100	1 stunda
CD8, peles monoklonālā, klons C8/114B, kods M7103	DAKO	1:100	1 stunda
Neitrofilo leikocītu elastāze, peles monoklonālā, klons NP57, kods M0752	DAKO	1:100	1 stunda

Pēc inkubācijas griezumi tika skaloti TBS buferī, tam sekoja pusstundu ilga inkubācija ar kazas biotinilēto sekundāro antivielu pret peles un truša audiem. Tad tika veikta pusstundu

ilga inkubācija ar streptavidīnu. Tad notika 7 minūtes vizualizācijas reakcija ar diaminobenzidīnu (DAB). Pēc preparātu skalošanas destilētā ūdenī, tiem uzpilināja līmi, kas bazēta uz ksilola, uzlika segstikliņu un mikroskopēja.

Katrā reakcijas etapā tika izmantota pozitīvā kontrole (aukslēju mandele) un negatīvā kontrole (primārās antivielas vietā uzpilinot antivielas atšķaidītāju).

NF- κ Bp65 un HDAC2 nokrāsošanās intensitātes imūnmorfoloģiskās reakcijas pakāpe tika novērtēta ar puskvantitatīvo metodi, subjektīvi nosakot šūnu nokrāsošanās intensitāti ar hromogēnu: negatīva reakcija (0), vāji pozitīva (1+), vidēji pozitīva (2+) un izteikti pozitīva (3+) reakcija. Savukārt, NF- κ Bp65 ekspresiju novērtējām gan kodolā, gan citoplazmā.

Šūnu skaits centrālajos elpceļos tika analizēts ar datorprogrammas *Motic Image Advanced 3. 2* versiju (*Motic, Xyamen, Ķīna*). Centrālajos elpceļos tika novērtēta epitēlija, subepitēlija zona līdz zemgļotādas dziedzeriem. Perifērajos elpceļos tika novērtēts šūnu skaits epitēlijā, subepitēlijā un adventīcijā. Šūnu skaitu izteicām uz laukuma vienību ($1/\text{mm}^2$). Šāda šūnu skaitīšanas metode centrālajos un perifērajos elpceļos atbilst vispārpieņemtiem un rekomendējamiem standartiem plaušu audu novērtēšanai (Boer, 2001).

5.3. Datu statistiskā apstrāde

Pacientu sadalījuma pārbaude veikta ar Kolmogorova-Smirnova testu. Normālā sadalījuma neatbilstības gadījumā izmantoti neparametriskie testi.

Grupas tika salīdzinātas, izmantojot ANOVA metodi funkcionālajiem datiem, Kruskala-Volisa testu (*Kruskal-Wallis*) ar sekojošu Danna (*Dunns*) pēctestu morfoloģiskajiem datiem (šūnu skaitam). Ja rezultāti starp grupām bija statistiski ticami, tad pēc ANOVA testa veica nepāra t-testu, bet pēc Kruskala-Volisa testa - Manna Vitnija (Mann-Whitbey) U testu.

Korelācijas tika vērtētas ar Spīrmana (*Spearman*) testu. Rezultāti tika novērtēti kā statistiski ticami, ja $p < 0.05$.

Attēlos šūnu skaitīšanas dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls) (*median (range)*), bet antropometrisko rādītāju un izsmēķēto pakgadu dati, kā vidējais \pm mainīgā lieluma standartnovirze (SD).

Visi dati tika statistiski apstrādāti, izmantojot statistikas programmas *GraphPadPrism* ceturto versiju (*San Diego, California, USA*).

6. REZULTĀTI

6.1. Pacientu raksturojums

Pētījumā iesaistīto pacientu klīniskie un plaušu funkcionālie rādītāji ir atspoguļoti 5. tabulā. Kā izriet no pētījuma iekļaušanas kritērijiem, HOPS pacientu FEV₁% un FEV₁/FVC% statistiski ticami atšķiras no asimptomātisko smēķētāju un nesmēķētāju FEV₁% un FEV₁/FVC%. Netika atrasta ticama atšķirība starp pacientu grupu ar atšķirīgu vecumu, dzimumu, augumu vai svaru. Turklāt asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem netika atrastas atšķirības starp izsmēķētājiem pakgadiem (27 ± 11, salīdzinot ar 30 ± 14, pakgadi). Nesmēķētāji, asimptomātiskie smēķētāji un HOPS pacienti pārsvarā bija vīrieši.

5. tabula. Pētījumā iekļauto personu raksturojumi (angl. Subjects characteristics).

Rezultāti izteikti kā vidējais ± mainīgā lieluma standartnovirze (SD). FEV₁- forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē; FEV₁/FVC-forsētās izelpas tilpums pirmajā sekundē/forsētā vitālā kapacitāte. *p<0,05, salīdzinot HOPS pacientus un nesmēķētājus.

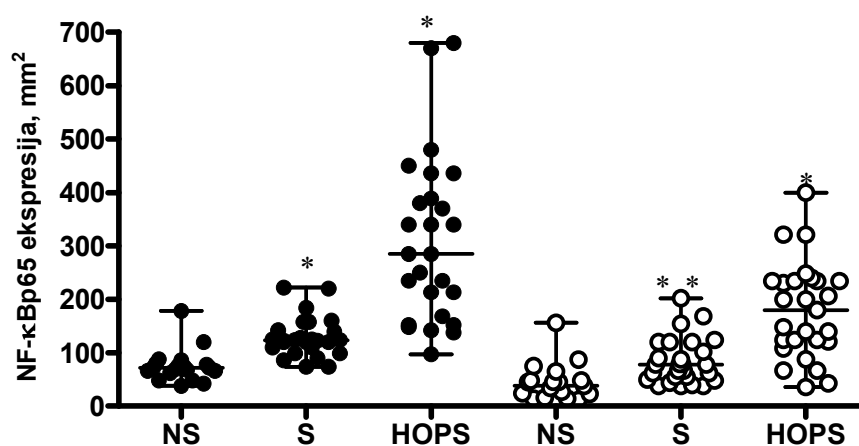
Pacientu grupa	Pacienti, n	Vecums gadi	Izsmēķētie pakgadi	FEV ₁ %	FEV ₁ /FVC %	Vīriešu/sieviešu attiecība	Augums, cm	Svars, kg
Nesmēķētāji	19	64 ± 10	---	93 ± 21	79 ± 7	15:4	170 ± 9	81 ± 14
Asimptomātiskie smēķētāji	28	61 ± 10	27 ± 11	90 ± 16	76 ± 7	24:4	174 ± 12	78 ± 12
HOPS pacienti	25	62 ± 7	30 ± 14	54 ± 7*	59 ± 8*	20:5	175 ± 7	77 ± 15

6.2. Nukleārā faktora-κBp65 (NF-κBp65) ekspresija centrālajos un perifērajos elpceļos

13. attēlā ir parādīts NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaits nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS). Kopējais NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaits centrālajos elpceļos bija būtiski lielāks HOPS pacientiem (318 šūnas/mm² (97–680)) nekā nesmēķētājiem (75 šūnas/mm² (38–178)), p < 0,0001) un

asimptomātiskajiem smēķētājiem (132 šūnas/mm² (72–222), $p < 0,0001$). Līdzīga likumsakarība tika iegūta attiecībā uz NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu perifērajos elpceļos. Šo šūnu infiltrācija perifērajos elpceļos bija būtiski augstāka HOPS pacientiem (175 šūnas/mm² (36–400)) nekā nesmēķētājiem (42 šūnas/mm² (8–156), $p < 0,0001$) un asimptomātiskajiem smēķētājiem (87 šūnas/mm² (38–202), $p = 0,04$)).

Salīdzinot NF-κBp65 ekspresiju grupās starp centrālajiem un perifērajiem elpceļiem, konstatējām, ka nesmēķētājiem NF-κBp65 pozitīvo šūnu ir vairāk centrālajos nekā perifērajos elpceļos ($p = 0,007$). Līdzīga likumsakarība tika iegūta, analizējot šūnu skaitu asimptomātiskajiem smēķētājiem ($p = 0,003$) un HOPS pacientiem ($p = 0,004$). Galvenās šūnas, kas ekspresē NF-κBp65, ir epitēlijšūnas, limfocīti un makrofāgi.

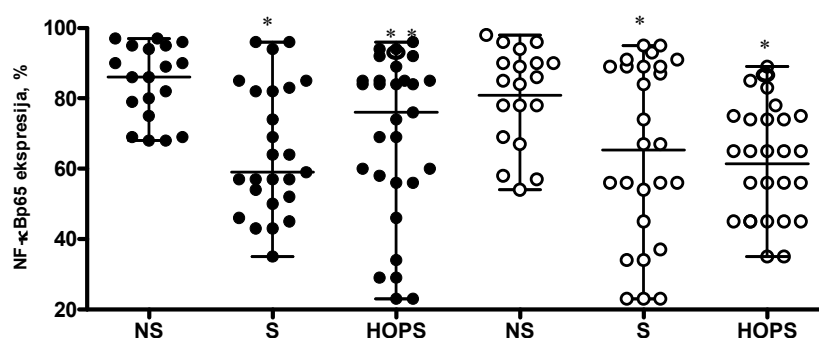


13. attēls. NF-κBp65 pozitīvās šūnas centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The number of NF-κBp65 positive cells in large and small airways of nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)].

Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), šūnas/mm². Katrs aplis parāda konkrētu indivīdu, melns aplis-šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis - šūnas perifērajos elpceļos, * $p < 0,0001$, salīdzinot HOPS pacientu un nesmēķētāju, asimptomātisko smēķētāju un nesmēķētāju centrālos elpceļus, un HOPS pacientu un nesmēķētāju perifēros elpceļus, ** $p = 0,04$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un nesmēķētāju perifēros elpceļus.

Analizējot šūnu sastāvu, kas ekspresē NF-κBp65, konstatējām, ka galvenās šūnas, kas ekspresē NF-κBp65 ir epitēlija šūnas, limfocīti un makrofāgi.

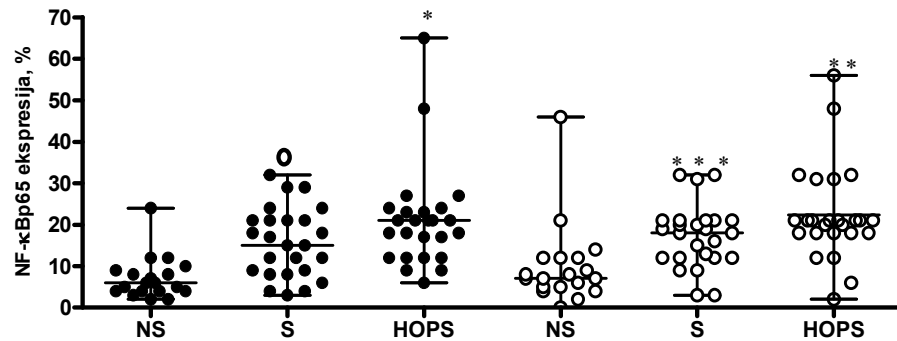
Nesmēķētājiem galvenās šūnas, kas ekspresē NF-κBp65, ir makrofāgi. Savukārt, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem, NF-κBp65 ekspresē gan makrofāgi un limfocītu, gan epitēlija šūnas (14. un 15. attēls).



14. attēls. NF-κBp65 pozitīvo makrofāgu relatīvais skaits centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The relative number of NF-κBp65 positive macrophages in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)].

Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), procentos. Katrs aplis parāda konkrētu indivīdu, melns aplis - relatīvais makrofāgu skaits centrālajos elpceļos, balts aplis - perifērajos elpceļos; * $p < 0,0001$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un nesmēķētāju centrālajos un perifēros elpceļus un nesmēķētāju un HOPS pacientu perifēros elpceļus;

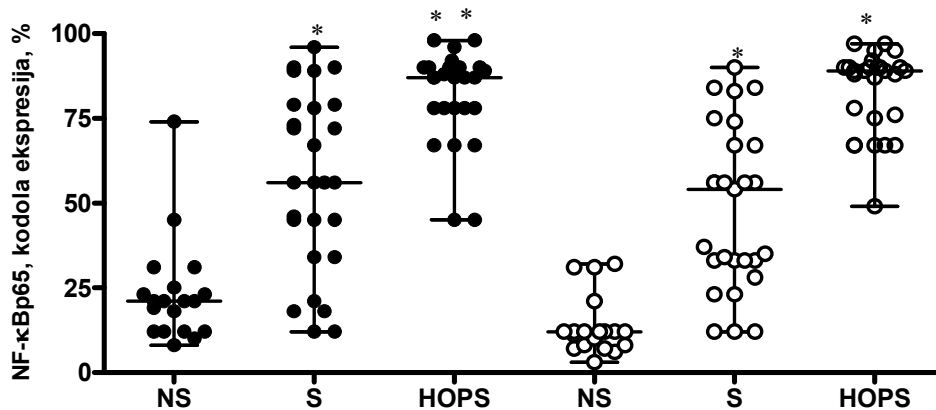
** $p = 0,04$, salīdzinot HOPS pacientu un nesmēķētāju centrālajos elpceļos.



15. attēls. NF-κBp65 pozitīvo limfocītu relatīvais skaits centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The relative number of NF-κBp65 positive lymphocytes in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)].

Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), procentos. Katrs aplis parāda konkrētu indivīdu, melns aplis - šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis-šūnas perifērajos elpceļos, * $p < 0.0001$, salīdzinot HOPS pacientu un nesmēķētāju centrālos elpceļus, $p = 0.0007$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un nesmēķētāju, kā arī asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu centrālos elpceļus ** $p < 0.0004$, salīdzinot nesmēķētāju un HOPS pacientu perifēros elpceļus, *** $p = 0.0005$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un nesmēķētāju perifēros elpceļus.

Analizējot NF-κBp65 ekspresijas īpatnības, novērojām, ka nesmēķētājiem NF-κBp65 atrodas galvenokārt citoplazmā, bet asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem - kodolā (skat. 16. attēlu). Šie rādītāji būtiski neatšķiras centrālajos un perifērajos elpceļos.

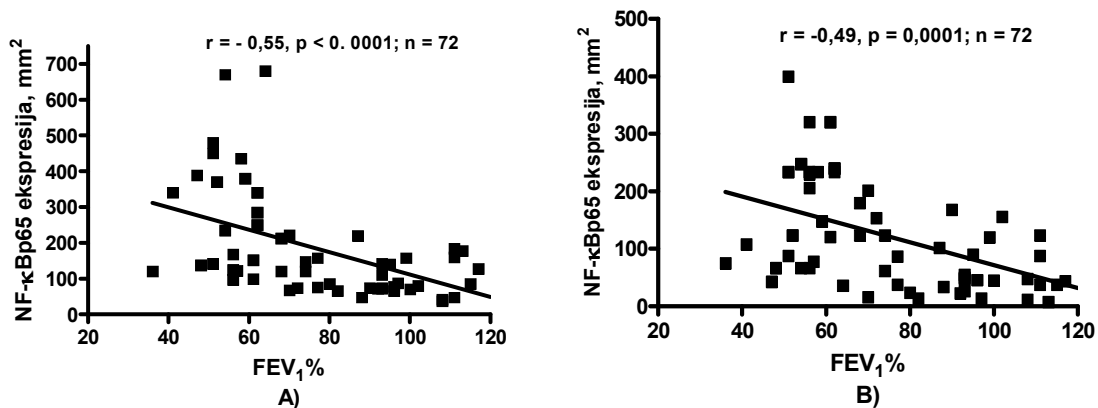


16. attēls. NF-κBp65 kodola lokalizācija procentos (%) centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The NF-κBp65 nuclear localization (percentage, %) in the cells of large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)]. Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), procentos. Katrs aplis parāda konkrētu individu, melns aplis - šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis - šūnas perifērajos elpceļos, * $p < 0,0001$, salīdzinot nesmēķētāju un asimptomātisko smēķētāju, nesmēķētāju un HOPS pacientu centrālos un perifēros elpceļus, ** $p = 0,0013$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu centrālos elpceļus.

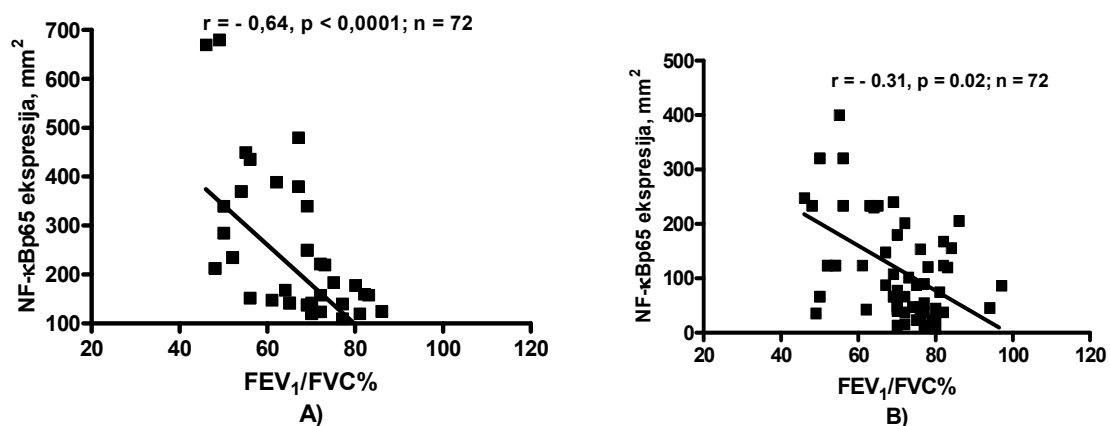
Analizējot visu grupu pacientus kopā, novērojām statistiski ticamu negatīvu korelāciju starp NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos elpceļos un elpceļu obstrukciju, $FEV_1\%$ ($r = -0,55$; $p < 0,0001$) un $FEV_1/FVC\%$ ($r = -0,64$; $p < 0,0001$).

Līdzīga negatīvā korelācija tika iegūta, analizējot NF-κBp65 šūnu skaitu perifērajos elpceļos un $FEV_1\%$ ($r = -0,49$; $p = 0,0001$) un $FEV_1/FVC\%$ ($r = -0,31$; $p = 0,02$) (skat. 17. un 18. attēlu).

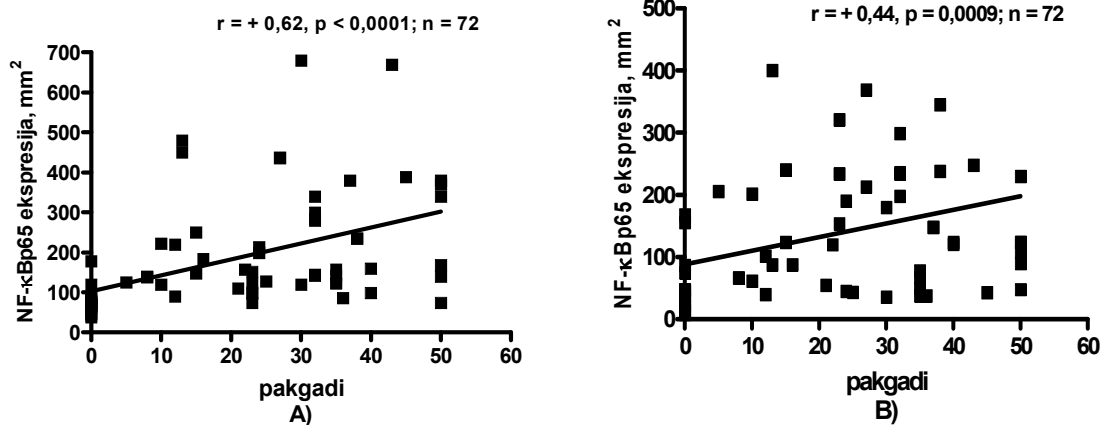
Kad visi pacienti tika analizēti kopā, ieguvām pozitīvu korelāciju starp NF-κBp65 šūnu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos un izsmēķētājiem pakgadiem ($r = +0,62$, $p < 0,0001$ un atbilstoši $r = +0,44$, $p = 0,0009$; skat. 19. attēlu).



17. attēls. Korelācija starp FEV₁% un NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of NF-κBp65 positive cells and FEV₁% in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.

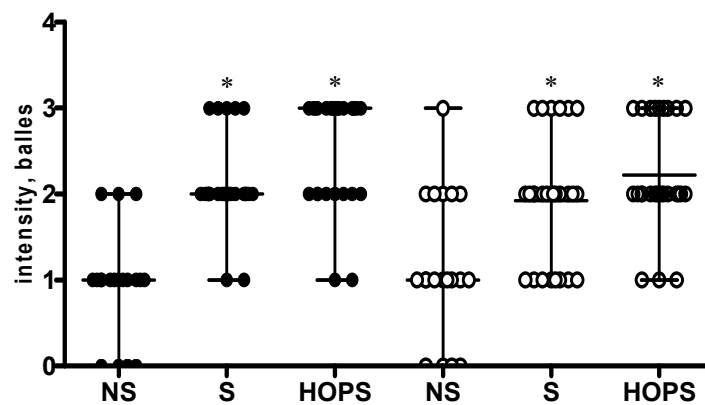


18. attēls. Korelācija starp FEV₁/FVC% un NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of NF-κBp65 positive cells and FEV₁/FVC% in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.

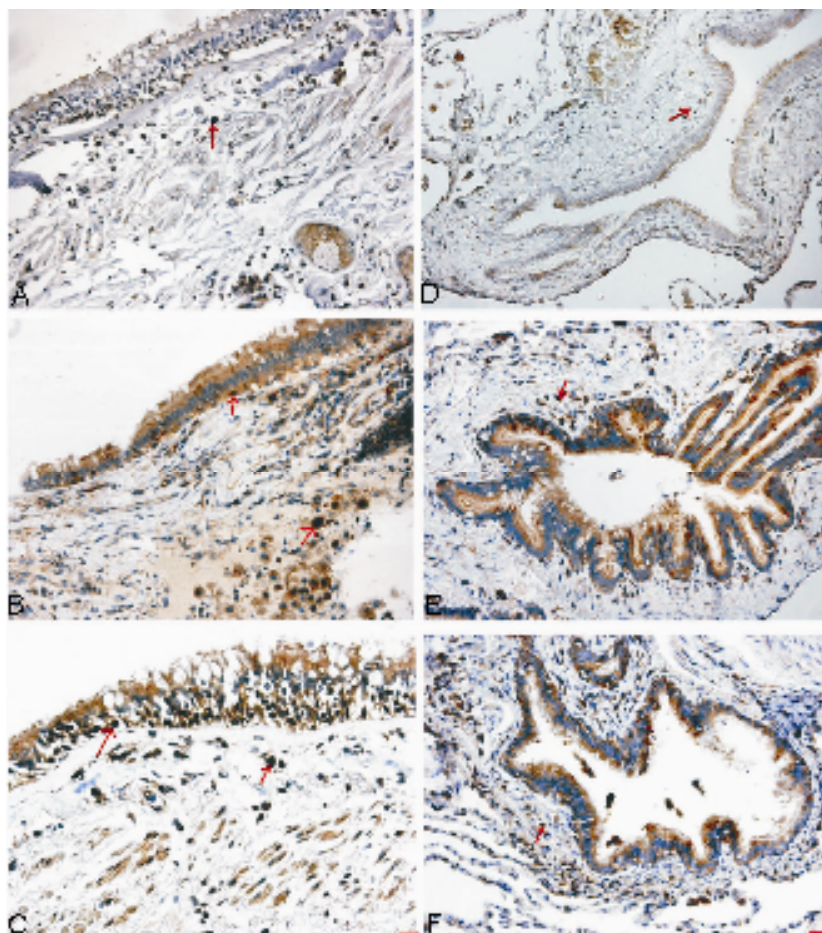


19. attēls. Korelācija starp izsmēķētajiem pakgadiem un NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of NF-κBp65 positive cells and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.

Analizējot epitēlija nokrāsošanās intensitāti ar NF-κBp65, novērojām, ka gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos HOPS pacientiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem nokrāsošanās intensitāte ir lielāka nekā nesmēķētājiem (20.attēls).



20. attēls. Epitēlija nokrāsošanās intensitāte (intensity) centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The NF-κBp65 epithelial staining intensity in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)]. Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), procentos. Katrs aplis parāda konkrētu individu, melns aplis - šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis - šūnas perifērajos elpceļos * p < 0.0001, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu, kā arī nesmēķētāju un asimptomātisko smēķētāju, un nesmēķētāju un HOPS pacientu centrālos un perifēros elpceļus.



21. attēls. NF-κBp65 ekspresija nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C) centrālajos elpceļos un nesmēķētājiem (D), asimptomātiskajiem smēķētājiem (E) un HOPS pacientiem (F) perifērajos elpceļos (angl. The NF-κBp65 expression in large airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C), and in small airways of nonsmokers (D), asymptomatic smokers (E) and COPD patients (F). A–C, palielinājumā $\times 100$, D–F, palielinājumā $\times 200$. Sarkanā bultā norāda NF-κBp65 pozitīvās šūnas.

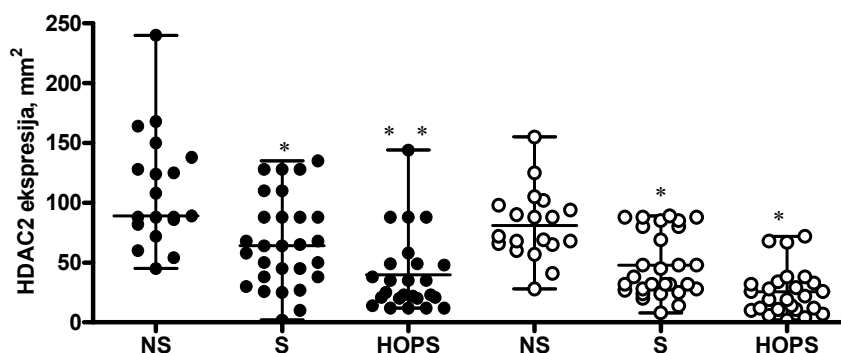
6.3. Histonu deacetilāzes 2. apakštipa (HDAC2) ekspresija centrālajos un perifērajos elpceļos

22. attēlā ir parādīts histonu deacetilāzes 2. subtipa (HDAC2) pozitīvo šūnu skaits nesmēķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.

Kopējais HDAC2 pozitīvo šūnu skaits centrālajos elpceļos bija būtiski mazāks HOPS pacientiem (25 šūnas/mm² (12 - 144)) nekā nesmēķētājiem (89 šūnas/mm² (45 - 240)), $p < 0,0001$) un asimptomātiskajiem smēķētājiem (64 šūnas/mm² (2 - 135), $p = 0,001$)).

Līdzīga likumsakarība tika konstatēta attiecībā uz HDAC2 pozitīvo šūnu skaitu perifērajos elpceļos. Šo šūnu infiltrācija perifērajos elpceļos bija būtiski zemāka HOPS pacientiem – (22 šūnas/mm² (2 - 72)) nekā nesmēķētājiem (72 šūnas/mm² (28 - 155), $p < 0,0001$)) un asimptomātiskajiem smēķētājiem (35 šūnas/mm² (8 - 89), $p < 0,001$)).

Salīdzinot HDAC2 ekspresiju starp centrālajiem un perifērajiem elpceļiem, konstatējām tendenci, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem HDAC2 pozitīvo šūnu ir mazāk perifērajos elpceļos, salīdzinot ar centrālajiem elpceļiem - 35 šūnas/mm² (8 - 89) un 61 šūnas/mm² (2 - 128), $p = 0,055$). Galvenās šūnas, kas ekspresē HDAC2, ir epitēlija šūnas, limfocīti un makrofāgi.



22. attēls. HDAC2 pozitīvās šūnas centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The number of HDAC2 positive cells in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)]. Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), šūnas uz 1 mm². Katrs aplis parāda konkrētu indivīdu, melns aplis - šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis - šūnas perifērajos elpceļos. ** $p < 0,0001$, salīdzinot HOPS pacientu un nesmēķētāju centrālos elpceļus, * $p < 0,001$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un nesmēķētāju centrālos elpceļus, kā arī HOPS pacientu un nesmēķētāju, un asimptomātisko smēķētāju un nesmēķētāju perifēros elpceļus.

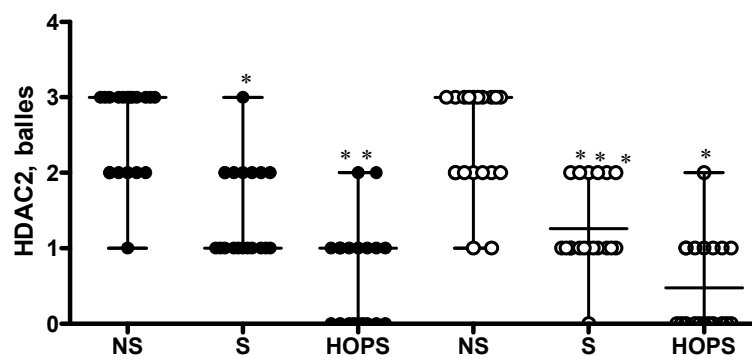
Savukārt, analizējot HDAC2 šūnas kodola nokrāsošanās intensitāti ar diaminobenzidīnu (DAB), novērojām, ka HOPS pacientiem HDAC2 ekspresija centrālo elpceļu epitēlijšūnās bija būtiski samazināta, pretstatā asimptomātiskajiem smēķētājiem ($p = 0,001$) un nesmēķētājiem ($p < 0,0001$).

Līdzīga likumsakarība tika novērota, analizējot perifēro elpceļu epitēlija nokrāsošanās intensitāti (sk. 23. attēlu). HOPS pacientiem HDAC2 aktivitāte ir vairāk nomākta perifērajos nekā centrālajos elpceļos.

Analizējot visu grupu pacientus kopā, ieguvām pozitīvu korelāciju starp HDAC2 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos elpceļos un $FEV_1\%$ ($r = +0,34$; $p = 0,008$) un $FEV_1/FVC\%$ ($r = +0,57$; $p < 0,0001$).

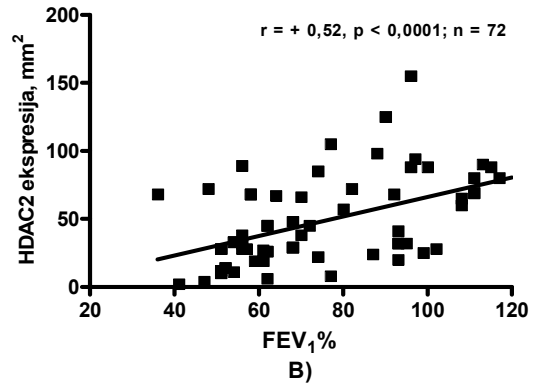
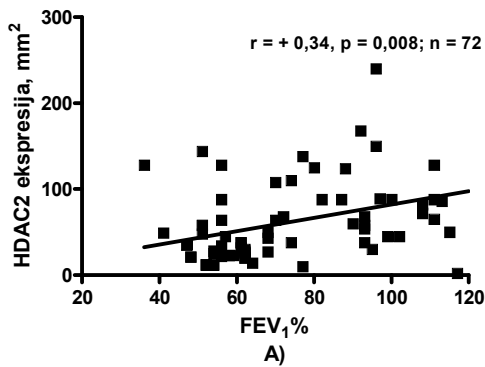
Līdzīga pozitīva korelācija, bet, ar lielāku ticamību, tika novērota, analizējot HDAC2 šūnu skaitu perifērajos elpceļos un $FEV_1\%$ ($r = +0,52$; $p < 0,0001$) un $FEV_1/FVC\%$ ($r = +0,54$; $p < 0,0001$) [sk. 24. un 25. attēlu].

Kad visi pacienti tika analizēti kopā, ieguvām negatīvu korelāciju starp HDAC2 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos un izsmēķētājiem pakgadiem ($r = -0,64$, $p < 0,0001$ un, atbilstoši, $r = -0,56$, $p < 0,0001$) [sk. 26. attēlu].

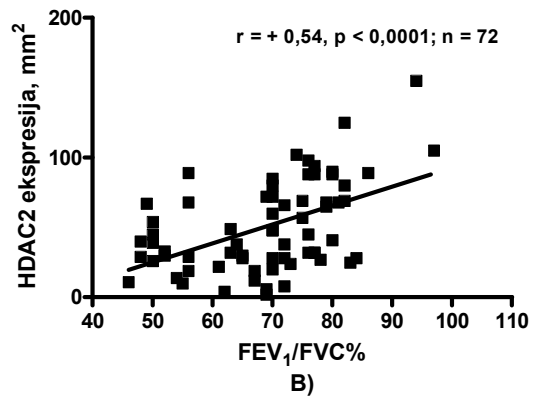
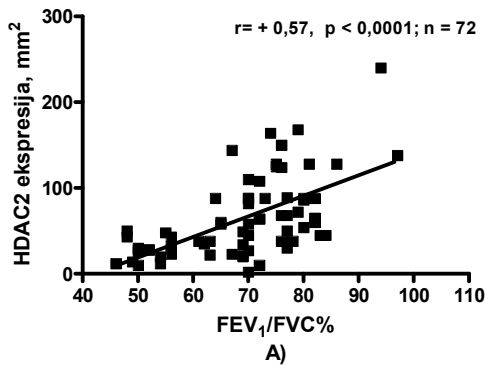


23. attēls. HDAC2 nokrāsošanās intensitāte bronhu epitēlijā ar DAB hromogēnu [angl. HDAC2 staining intensity of airways epithelium in large and small airways].

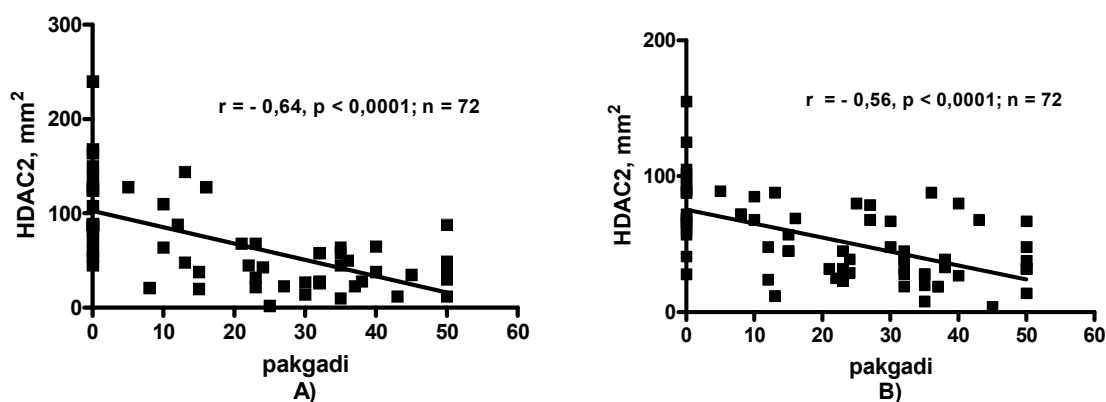
Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), šūnas uz 1 mm^2 . Katrs aplis parāda konkrētu indivīdu, melns aplis - šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis - šūnas perifērajos elpceļos, * $p < 0,0001$, salīdzinot nesmēķētāju un HOPS pacientu centrālos un perifēros elpceļus, *** $p = 0,0002$, salīdzinot nesmēķētāju un asimptomātisko smēķētāju perifēros elpceļus, ** $p = 0,001$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu centrālos elpceļus.



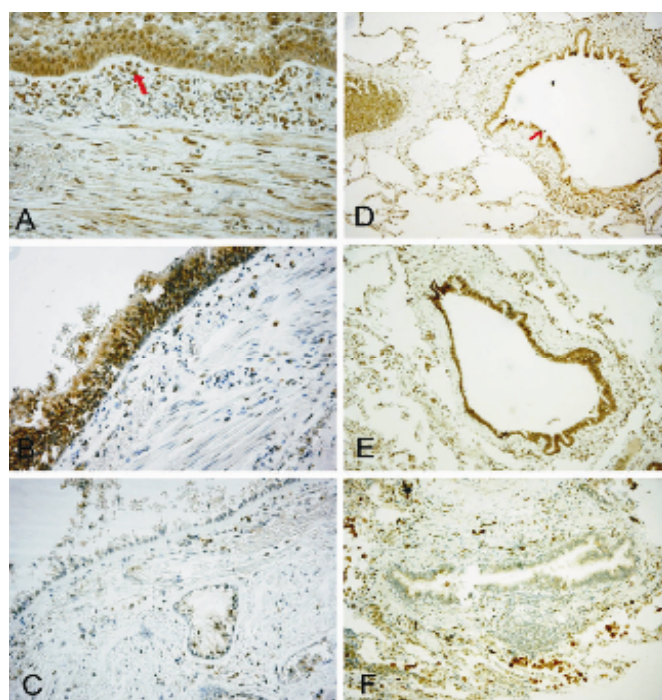
24. attēls. Korelācija starp FEV₁% un HDAC2 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of HDAC2 positive cells and FEV₁% in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



25. attēls. Korelācija starp FEV₁/FVC% un HDAC2 pozitīvo šūnu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (The correlation between the number of HDAC2 positive cells and FEV₁/FVC% in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



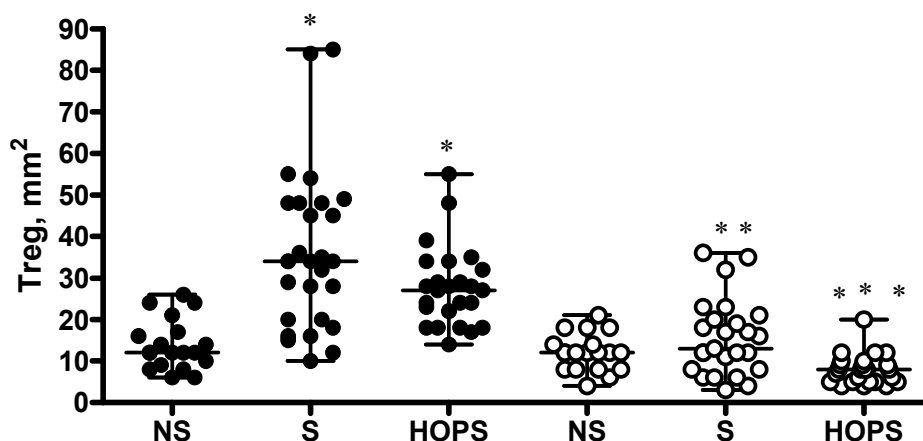
26. attēls. Korelācija starp HDAC2 pozitīvajām šūnām centrālajos (A) un perifērajos elpceļos un izsmēķētajiem pakgadiem (angl. The correlation between the number of HDAC2 positive cells and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



27. attēls. HDAC2 ekspresija nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C) centrālajos elpceļos un nesmēķētājiem (D), asimptomātiskajiem smēķētājiem (E) un HOPS pacientiem (F) perifērajos elpceļos (angl. The HDAC2 expression in large airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C), and in small airways of nonsmokers (D), asymptomatic smokers (E) and COPD patients (F). Palielinājumā $\times 100$ centrālajos elpceļos, skala = $25\mu\text{m}$ un palielinājumā $\times 200$ perifērajos elpceļos, skala = $50\mu\text{m}$. Sarkanā bulta parāda HDAC2 pozitīvās šūnas.

6.4. T regulatoro limfocītu (Treg) skaits centrālajos un perifērajos elpceļos

28. attēlā ir parādīts T regulatoro limfocītu (Treg) skaits nesmēķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem. Kopējais T regulatoro šūnu skaits centrālajos elpceļos bija būtiski lielāks asimptomātiskajiem smēķētājiem (35 (10–85) šūnas/mm²) un HOPS pacientiem (29 šūnas/mm² (13–55) pretstatā nesmēķētājiem (12 šūnas/mm² (6–26), $p < 0,0001$). Perifērajos elpceļos HOPS pacientiem Treg šūnu skaits bija būtiski mazāks (7 šūnas/mm² (2–19), salīdzinot ar nesmēķētājiem (13 šūnas/mm² (4–36), $p = 0,001$) un asimptomātiskajiem smēķētājiem (12 šūnas/mm² (3–28), $p = 0,006$).

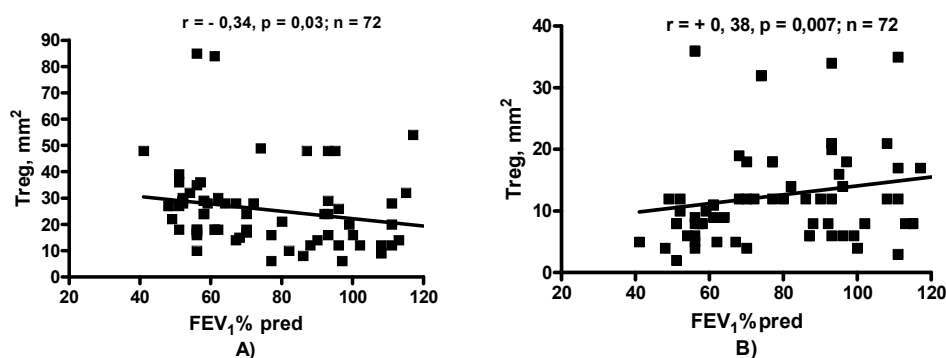


28. attēls. T regulatorās šūnas centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The number of FOXP3 positive cells in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)]. Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), šūnas uz 1 mm². Katrs aplis parāda konkrētu individu, melns aplis - šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis - šūnas perifērajos elpceļos, ** $p = 0,006$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu perifēros elpceļus, * $p < 0,0001$, salīdzinot nesmēķētāju un asimptomātisko smēķētāju, kā arī nesmēķētāju un HOPS pacientu centrālos elpceļos; *** $p = 0,001$, salīdzinot HOPS pacientu un nesmēķētāju perifēros elpceļus.

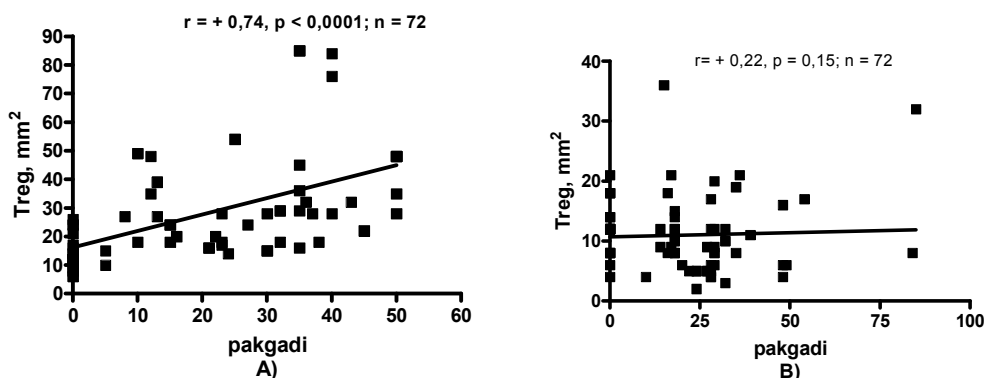
Iegūtie rezultāti parāda, ka Treg šūnu skaits nesmēķētājiem neatšķiras centrālajos un perifērajos elpceļos, savukārt asimptomātiskajiem smēķētājiem to ir vairāk centrālajos nekā perifērajos elpceļos ($p < 0,0001$), bet, savukārt, HOPS pacientiem šo šūnu ir mazāk perifērajos ($p < 0,001$) nekā centrālajos elpceļos.

Analizējot visu grupu pacientus kopā, ieguvām negatīvu korelāciju starp T regulatoro limfocītu skaitu centrālajos elpceļos un FEV₁% ($r = -0,34$; $p = 0,03$), bet pozitīvu korelāciju perifērajos elpceļos- $r = +0,38$, $p = 0,007$ (sk. 29. attēlu).

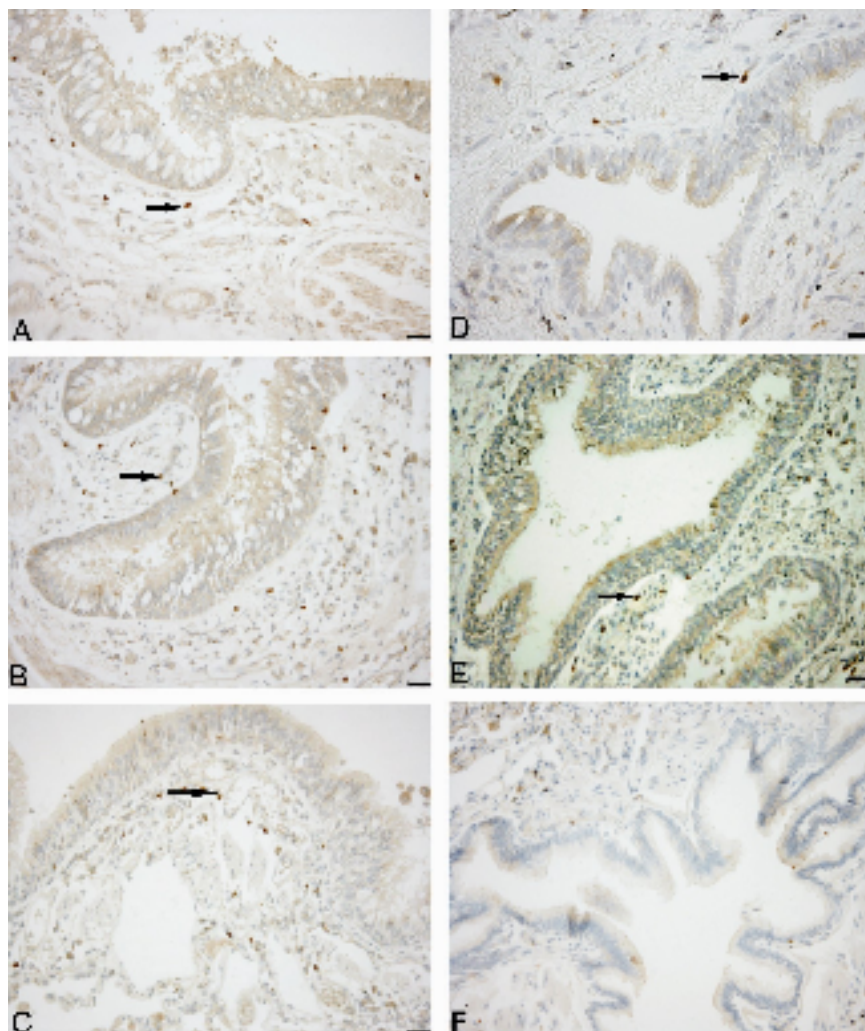
Darbā novērojām pozitīvu korelāciju starp Treg limfocītu skaitu centrālajos elpceļos un izsmēķētajiem pakgadiem ($r = +0,74$, $p < 0,0001$) (sk. 30. attēlu). Savukārt perifērajos elpceļos netika atrasta statistiski ticama korelācija starp T regulatorām šūnām un izsmēķētajiem pakgadiem.



29. attēls. Korelācija starp FEV₁% un T regulatorajiem limfocītiem centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of T regulatory cells and FEV₁% in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



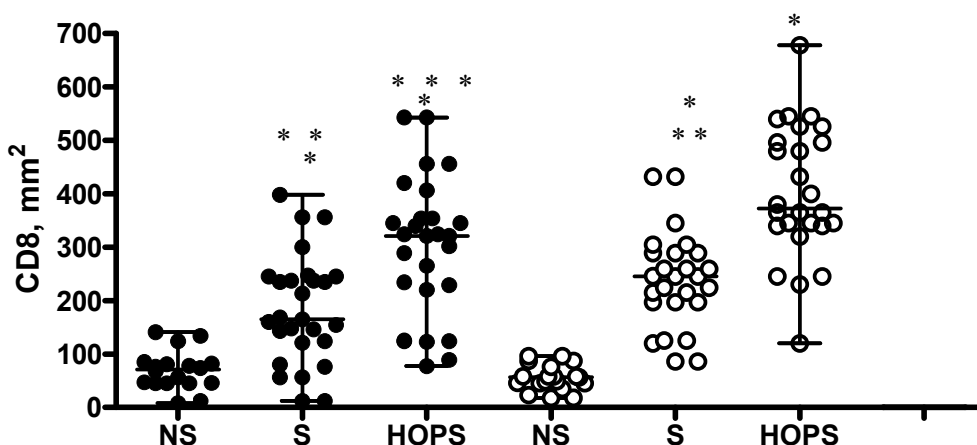
30. attēls. Korelācija starp izsmēķētajiem pakgadiem un T regulatorajiem limfocītiem centrālajos elpceļos (angl. The correlation between the number of T regulatory cells and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



31. attēls. T regulatorie limfocīti nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C) centrālajos elpceļos un nesmēķētājiem (D), asimptomātiskajiem smēķētājiem (E) un HOPS pacientiem (F) perifērajos elpceļos (angl. T regulatory cells in large airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C), and in small airways of nonsmokers (D), asymptomatic smokers (E) and COPD patients (F)). Melnā bultā parāda T regulatorās šūnas elpceļos. Palielinājums $\times 200$ (A-F), līnijas skala - $50\mu\text{m}$.

6.5. CD8 limfocītu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos

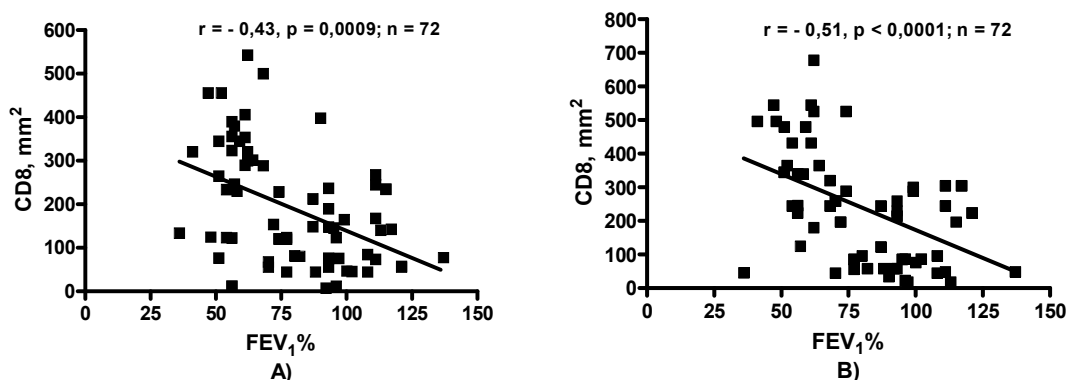
CD8 limfocītu absolūtais skaits centrālajos elpceļos bija būtiski lielāks HOPS pacientiem (321 šūnas/mm² (77–543)) nekā nesmēķētājiem (71 šūnas/mm² (8–141), $p < 0,0001$) un asimptomātiskajiem smēķētājiem (154 šūnas/mm² (12–398), $p = 0,0003$). Līdzīgi arī CD8 limfocītu absolūtais skaits perifērajos elpceļos bija būtiski lielāks HOPS pacientiem (432 šūnas/mm² (245–678)) nekā nesmēķētājiem (56 šūnas/mm² (18–96), $p < 0,0001$) un asimptomātiskajiem smēķētājiem (254 šūnas/mm² (86–432), $p = 0,0003$) (sk. 20. attēlu). HOPS pacientiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem CD8 limfocītu infiltrācija bija izteiktāka perifērajos elpceļos ($p < 0,001$) salīdzinājumā ar centrālajiem elpceļiem.



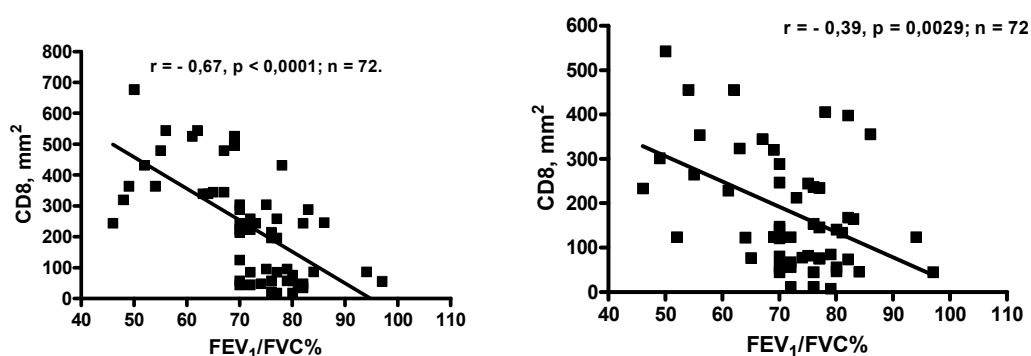
32. attēls. CD8 limfocīti centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The number of CD8 positive T lymphocytes in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)]. Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), šūnas uz 1 mm². Katrs simbols parāda konkrētu indivīdu, melns aplis - šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis - šūnas perifērajos elpceļos. ** $p = 0,001$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu perifēros elpceļus, * $p < 0,0001$, salīdzinot nesmēķētāju un asimptomātisko smēķētāju, kā arī nesmēķētāju un HOPS pacientu perifēros elpceļus un nesmēķētāju un HOPS pacientu centrālos elpceļus, ** $p = 0,0003$, salīdzinot nesmēķētāju un asimptomātisko smēķētāju centrālos elpceļus, *** $p = 0,0058$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu centrālos elpceļus.

Pētījumā novērojām negatīvu korelāciju starp FEV₁% un CD8 limfocītu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos (atbilstoši, $r = -0,43$; $p = 0,0009$ un $r = -0,51$, $p < 0,0001$), kā arī negatīvu korelāciju starp CD8 limfocītu skaitu elpceļos un FEV₁/FVC% (atbilstoši $r = -0,39$, $p = 0,0029$ un $r = -0,67$; $p < 0,0001$) [skat. 33. un 34.attēls].

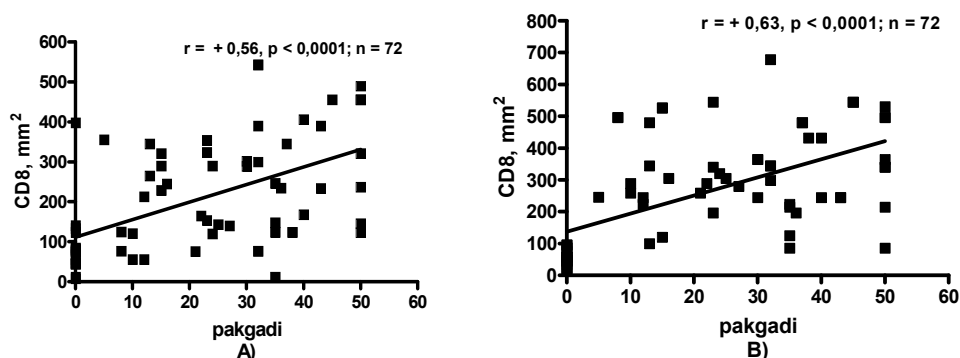
Turklāt, konstatējām pozitīvu korelāciju starp CD8 T limfocītu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos un izsmēķētajiem pakgadiem [skat. 35. attēlu].



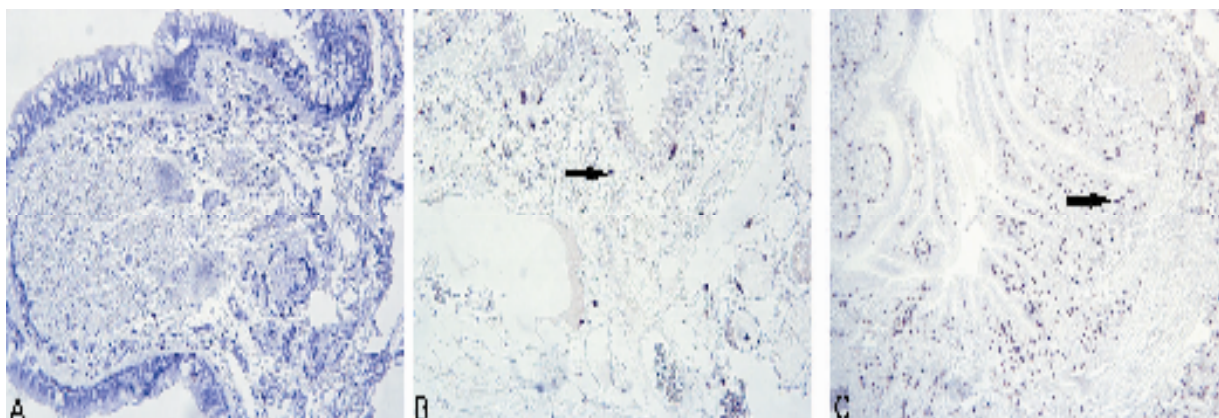
33. attēls. Korelācija starp FEV₁% un CD8 limfocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of CD8 positive T lymphocytes and FEV₁% in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



34. attēls. Korelācija starp FEV₁/FVC% un CD8 limfocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of CD8 positive T lymphocytes and FEV₁/FVC in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



35. attēls. Korelācija starp izsmēķētajiem pakgadiem un CD8 limfocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of CD8 positive T lymphocytes and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



36. attēls. CD8 limfocīti centrālajos elpceļos nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C) (angl. The CD8+ T lymphocytes in large airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C). Palielinājumā $\times 200$ (A-B) un $\times 100$ (C). CD8 limfocīti brūnā krāsā (DAB hromogēns), melnā bultā norāda uz CD8 limfocītiem.

6.6. Neitrofilo leikocītu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos

Neitrofilo leikocītu absolūtais skaits centrālajos elpceļos bija būtiski lielāks HOPS pacientiem (290 šūnas/ mm^2 ($90 - 457$)) nekā nesmēķētājiem (87 šūnas/ mm^2 ($23 - 518$), $p < 0,0001$).

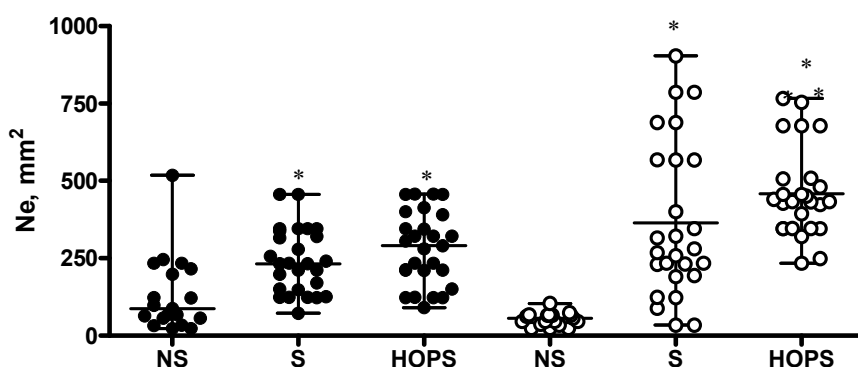
Līdzīgi arī asimptomātiskajiem smēķētājiem neitrofilo leukocītu skaits bija būtiski lielāks (234 šūnas/mm² (72-456) nekā nesmēķētājiem (87 šūnas/mm² (23 - 518), $p < 0.0001$). Pētījumā netika atrasta statistiski ticama neitrofilo leukocītu skaita atšķirība centrālajos elpceļos asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.

Neitrofilo leukocītu absolūtais skaits perifērajos elpceļos bija būtiski augstāks HOPS pacientiem (433 šūnas/mm² (234 - 754)) nekā nesmēķētājiem (56 šūnas/mm² (23 - 104), $p < 0,0001$) un asimptomātiskajiem smēķētājiem (268 šūnas/mm² (34 - 904), $p = 0.01$ (skat. 37. attēlu).

Pētījumā konstatējām, ka HOPS pacientiem ir izteiktāka perifēro elpceļu infiltrācija ar neitrofilajiem leukocītiem, salīdzinājumā ar centrālajiem elpceļiem.

Netika atrasta statistiski ticama atšķirība starp neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem.

Savukārt, HOPS pacientiem neitrofilo leukocītu infiltrācija ir izteiktāka perifērajos nekā centrālajos elpceļos ($p=0,01$).

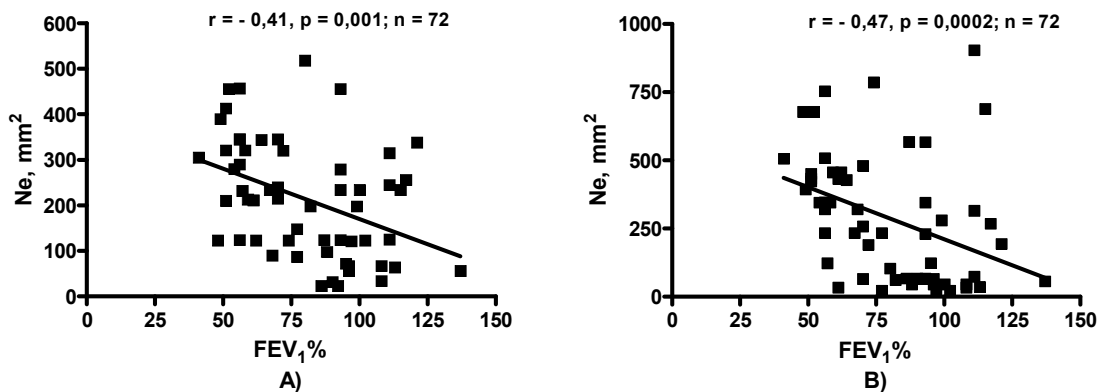


37. attēls. Neitrofilo leukocītu (Ne) absolūtais skaits centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The number of neutrophils in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)]. Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), šūnas uz 1 mm². Katrs simbols parāda konkrētu indivīdu, melns aplis - šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis - šūnas perifērajos elpceļos, * $p < 0,0001$, salīdzinot nesmēķētāju un asimptomātisko smēķētāju, kā arī nesmēķētāju un HOPS pacientu centrālajos elpceļos un nesmēķētāju un HOPS pacientu perifēros elpceļos, ** $p = 0,01$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu perifēros elpceļos.

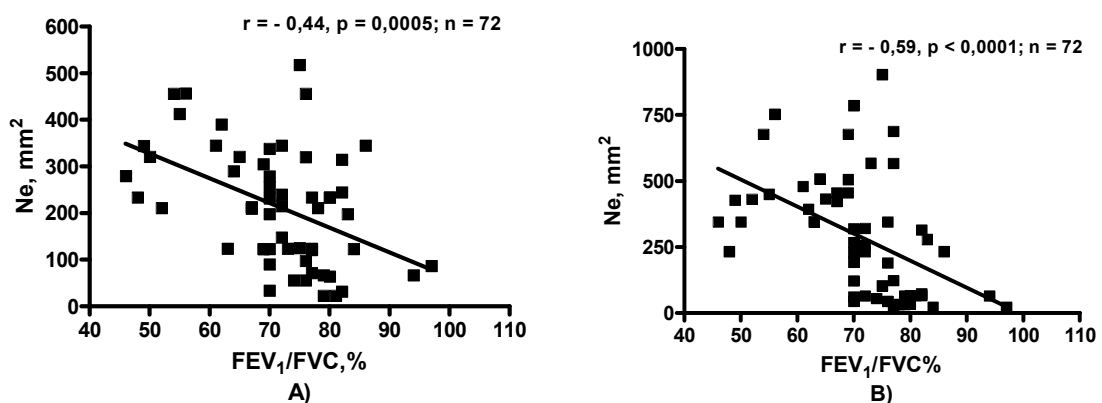
Pētījumā tika iegūta statistiski ticama negatīvā korelācija starp neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos ($r = -0,41$; $p = 0,0014$) un perifērajos elpceļos ($r = -0,47$; $p = 0,0002$) un $FEV_1\%$ (skat. 38. attēlu).

Līdzīgi pētījumā novērojām negatīvu korelāciju starp neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos ($r = -0,44$, $p = 0,0005$) un perifērajos elpceļos ($r = -0,59$, $p < 0,0001$) un elpceļu obstrukciju $FEV_1/FVC\%$ (skat. 39. attēlu).

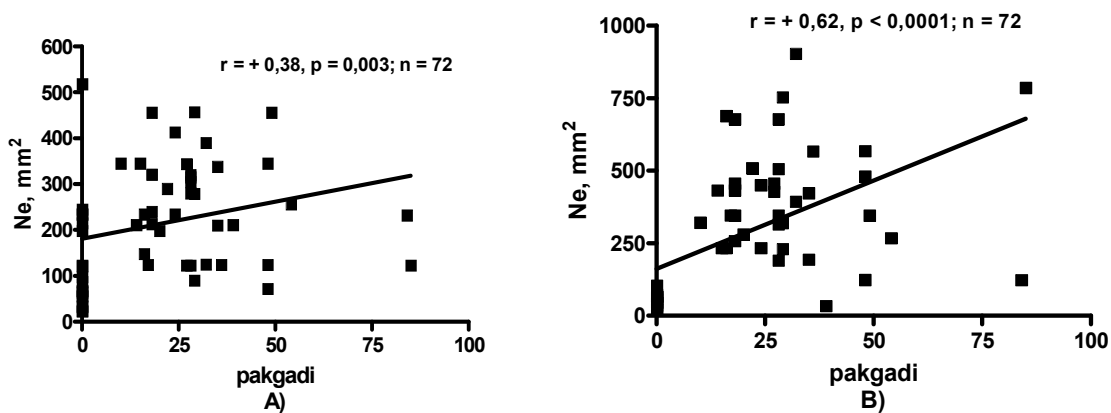
Toties ieguvām pozitīvu korelāciju starp neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos un izsmēķētajiem pakgadiem ($r = +0,38$, $p = 0,003$ un $r = +0,62$, $p < 0,0001$) (skat. 40. attēlu).



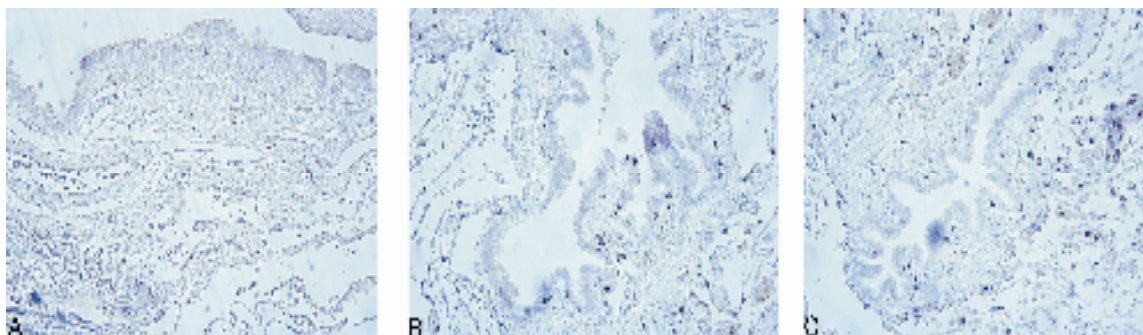
38. attēls. Korelācija starp $FEV_1\%$ un neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of neutrophils and $FEV_1\%$ in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



39. attēls. Korelācija starp $FEV_1/FVC\%$ un neitrofilo leukocītu skaitu (Ne) centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of neutrophils and $FEV_1/FVC\%$ in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests, katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



40. attēls. Korelācija starp izsmēķētajiem pakgadiem un neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of neutrophils and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.

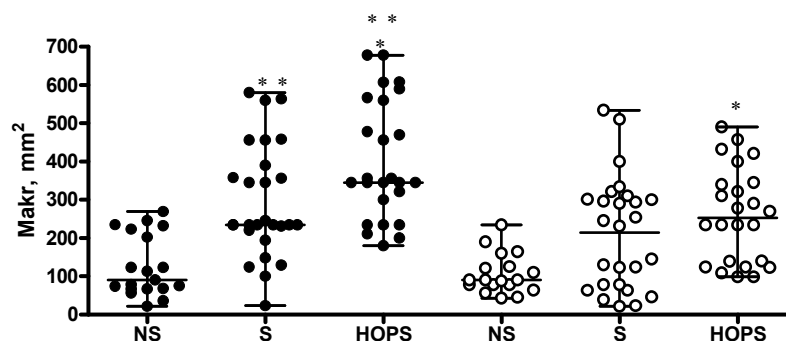


41. attēls. Neitrofilie leukocīti perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (A), asimptomātiskajiem smēķētājiem (B) un HOPS pacientiem (C). (Neutrophils in small airways of nonsmokers (A), asymptomatic smokers (B) and COPD patients (C). Palielinājumā $\times 200$, neitrofilie leukocīti brūnā krāsā (DAB hromogēns).

6.7. Makrofāgu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos

42. attēlā parādīts makrofāgu skaits visām grupām centrālajos un perifērajos elpceļos. Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka makrofāgu absolūtais skaits centrālajos elpceļos bija būtiski lielāks HOPS pacientiem (456 šūnas/mm² (210–800)) nekā nesmēķētājiem (90 šūnas/mm² (21–269), $p = 0,0003$) un asimptomātiskajiem smēķētājiem (234 šūnas/mm² (23–564), $p = 0,009$).

Savukārt makrofāgu skaits perifērajos elpceļos HOPS pacientiem (274 šūnas/mm² (98–490)) un asimptomātiskajiem smēķētājiem (250 šūnas/mm² (21–534)) bija būtiski lielāks nekā nesmēķētājiem (90 šūnas/mm² (43–234), $p < 0,0001$ un, atbilstoši $p = 0,01$). Pētījumā konstatējām, ka HOPS pacientiem ir izteiktākā centrālo nekā perifēro elpceļu infiltrācija ar makrofāgiem ($p = 0,002$).



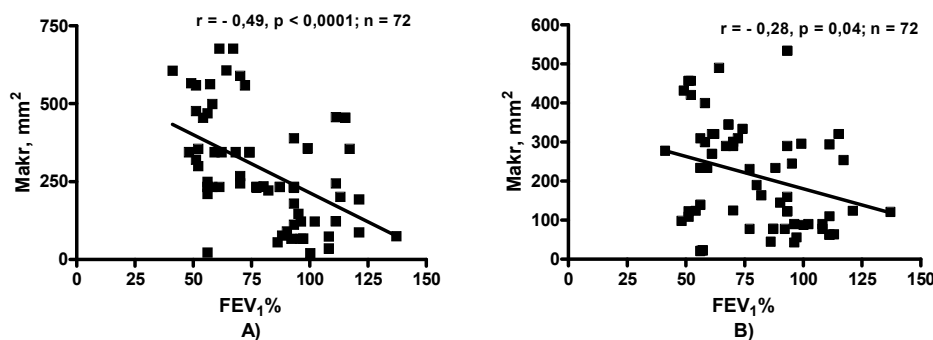
42. attēls. Makrofāgu (Makr) absolūtais skaits centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem (NS), asimptomātiskajiem smēķētājiem (S) un HOPS pacientiem (HOPS) [angl. The number of macrophages in large and small airways in nonsmokers (NS), asymptomatic smokers (S) and COPD patients (COPD)].

Dati izteikti kā mediāna (mediānas reprezentācijas intervāls), šūnas uz 1 mm². Katrs simbols parāda konkrētu individu, melns aplis - šūnas centrālajos elpceļos, balts aplis - šūnas perifērajos elpceļos, * $p=0,009$, salīdzinot nesmēķētāju un HOPS pacientu centrālos elpceļus, ** $p=0,009$, salīdzinot asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu centrālos elpceļus un ** $p=0,0003$, salīdzinot nesmēķētāju un asimptomātisko smēķētāju centrālos elpceļus; * $p<0,0001$, salīdzinot nesmēķētāju un HOPS pacientu perifēros elpceļus.

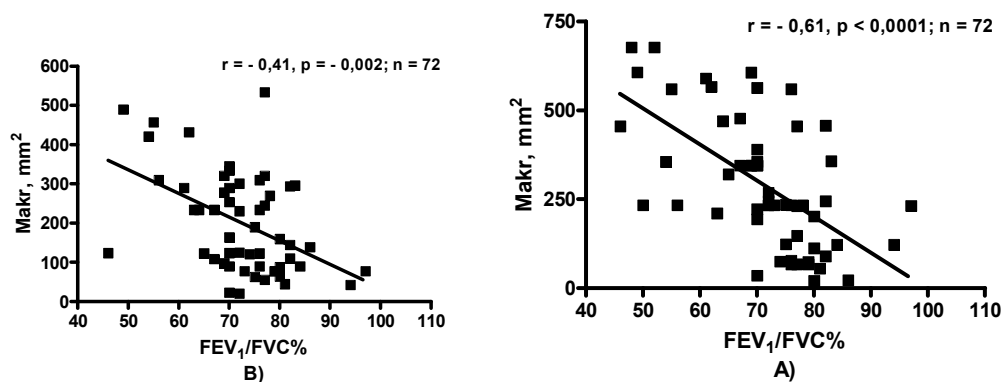
Analizējot visu grupu pacientus kopā, ieguvām negatīvu korelāciju starp makrofāgu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos un FEV₁% (atbilstoši $r = -0,49$; $p < 0,0001$ un $r = -0,28$; $p = 0,04$) (skat. 43. attēlu).

Līdzīgi tika iegūta negatīva korelācija starp FEV₁/FVC% un makrofāgu skaitu centrālajos ($r = -0,61$, $p < 0,0001$) un perifērajos elpceļos ($r = -0,41$, $p = 0,002$) (skat. 44. attēlu).

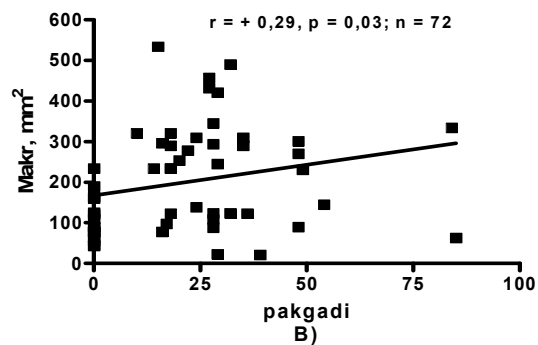
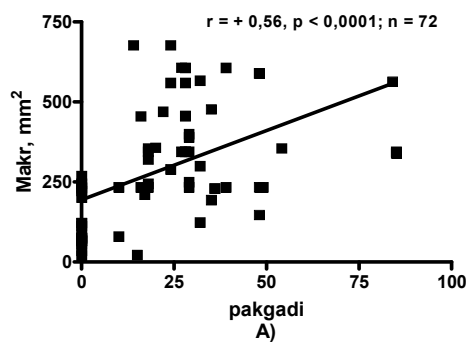
Pētījumā konstatējām pozitīvu korelāciju starp makrofāgu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos un izsmēķētajiem pakgadiem ($r = +0,56$, $p < 0,0001$ un $r = +0,29$, $p = 0,03$) (skat. 45. attēlu).



43. attēls. Korelācija starp FEV₁% un makrofāgu skaitu (Makr) centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of macrophages and FEV₁% in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



44. attēls. Korelācija starp FEV₁/FVC% un makrofāgu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos. (angl. The correlation between the number of macrophages and FEV₁/FVC in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.



45. attēls. Korelācija starp izsmēķētajiem pakgadiem un makrofāgu skaitu centrālajos (A) un perifērajos (B) elpceļos (angl. The correlation between the number of macrophages and smoked pack-years in large (A) and small (B) airways). Spīrmana tests. Katrs kvadrāts apzīmē noteiktu pacientu.

7. DISKUSIJA

Pētījuma mērķis bija novērtēt, vai pastāv atšķirība starp iekaisuma procesa mehānismiem centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un vidēji smagas pakāpes HOPS pacientiem, kā arī izvirzīt iespējamus kritērijus HOPS terapijas efektivitātes novērtēšanā un prognozē.

Darba uzdevumi bija - noskaidrot nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) un otrā tipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresiju, kā arī novērtēt CD8 T limfocītu, makrofāgu, neitrofilo leukocītu un T regulatoro limfocītu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem, smēķētājiem ar normālu plaušu ventilācijas funkciju (asimptomātiskie smēķētāji) un vidēji smagas pakāpes HOPS pacientiem, un izvirzīt iespējamus kritērijus HOPS terapijas efektivitātes novērtēšanai un prognozei.

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem iekaisuma šūnu infiltrācija (makrofāgi, neitrofilie leukocīti un CD8+ T limfocīti), NF- κ Bp65 un HDAC2 ekspresija ir atšķirīga centrālajos un perifērajos elpceļos.

HOPS pacientiem iekaisuma šūnu infiltrācija un NF- κ Bp65 ekspresija ir palielināta, bet HDAC2 ekspresija-samazināta gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos, pretstatā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem.

Darbā iegūtie rezultāti parāda, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem centrālajos elpceļos novērojams FOXP3 pozitīvu T regulatoro limfocītu (Treg) skaita pieaugums, kas korelē ar izsmēķētājiem pakgadiem. Savukārt, perifērajos elpceļos HOPS pacientiem Treg šūnu skaits bija samazināts, kas korelē ar elpceļu obstrukciju.

Mūsu pētījuma rezultāti rāda, ka NF- κ Bp65 pozitīvo šūnu absolūtais skaits gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos bija būtiski augstāks HOPS pacientiem, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem.

Pētījumā konstatējām, ka nesmēķētājiem NF- κ Bp65 galvenokārt lokalizējās šūnu citoplazmā, bet asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem - kodolā.

Līdzīgi arī HOPS pacientiem bija novērota palielināta elpceļu epitēlija NF- κ Bp65 ekspresija, salīdzinājumā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem.

Darbā novērojām negatīvu korelāciju starp NF-κBp65 pozitīvu šūnu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos un elpceļu obstrukcijas rādītājiem - FEV₁% un FEV₁/FVC%.

Galvenās iekaisuma šūnas visās trijās pētījuma pacientu grupās, kas ekspresē NF-κB, ir makrofāgi, savukārt, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem pieaug NF-κB ekspresija arī limfocītos.

Ir zināms, ka transkripcijas faktors NF-κB izraisa to gēnu ekspresiju, kuri atbild par iekaisumu (Barnes, 1997, 1998, 2005; Christman, 2000). No tiem svarīga nozīme ir IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α un ICAM-1. Šo iekaisuma mediatoru sintēzi tieši regulē NF-κB.

Ir zināmi vairāki NF-κB aktivētāji, piemēram, citokīni (TNFα un TNFβ, IL-1β, IL-2, IL-6), oksidanti (tabakas dūmi, hiperoksija, ozons), augšanas faktori (GM-CSF), baktērijas un vīrusi (gripas vīruss, adenovīruss), kā arī lipopolisaharīdi, hipoksija un ultravioletais starojums (Barnes, 1997; Dummount, 1999; Lakshminarayanan, 1996).

TNFα, TNFβ, IL-1β, IL-2, IL-6, lipopolisaharīdi un ultravioletais starojums izraisa NF-κB aktivāciju, palielinot reaktīvā skābekļa radikāļu atbrīvošanos no mitohondrijiem, kas tieši aktivē šo faktoru (Rahman, 2000).

Ir konstatēts, ka ierosinātajās krēpās, kas iegūtas HOPS paasinājuma laikā, NF-κB makrofāgos ir aktivēts (Caramori, 2003). HOPS paasinājumu sekmē baktērijas un vīrusi, kas spēj aktivēt NF-κB. Visizteiktāk NF-κB aktivē adenovīruss un Haemophilus influenzae (Rahman, 2000). Citos pētījumos tika parādīts, ka, pieaugot NF-κB aktivitātei, samazinās tā inhibētāja faktora I-κB ekspresija asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem (Szulakowski, 2006).

Pētot centrālo bronhu biopsiju materiālu, *Di Stefano et al.* konstatēja, ka HOPS pacientiem centrālajos elpceļos NF-κBp65 pozitīvu šūnu skaits bija lielāks, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem (Di Stefano, 2002).

Savukārt, analizējot NF-κBp65 ekspresiju ar *Western blot* metodi, šo pētnieku grupa konstatēja, ka nesmēķētājiem NF-κBp65 aktivitāte bronhos ir mazāka, salīdzinot ar asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem. Šo novērojumu apstiprina arī mūsu pētījuma rezultāti, izmantojot šūnas kodola nokrāsošanās intensitāti ar hromogēnu (diaminobenzidīns, DAB).

Gan mūsu, gan *Di Stefano et al.* pētījumā tika iegūta līdzīga korelācija starp NF-κBp65 pozitīvu šūnu skaitu centrālajos elpceļos un elpceļu obstrukcijas rādītājiem - FEV₁% un FEV₁/FVC% (Di

Stefano, 2002). Turklāt, mūsu pētījumā tika parādīts, ka NF-κBp65 ekspresija smēķētājiem un HOPS pacientiem ir palielināta ne tikai centrālajos, bet arī perifērajos elpceļos, kas korelēja ar izsmēķētājiem pakgadiem un elpceļu obstrukcijas rādītājiem.

Mūsu pētījuma dati liecina, ka NF-κBp65 ekspresija asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem ir vairāk izteikta centrālajos nevis perifērajos elpceļos, kas izskaidrojams ar palielinātu makrofāgu daudzumu tieši centrālajos elpceļos.

Makrofāgi ir galvenās iekaisuma šūnas, kas ekspresē NF-κB (ap 60-80%). Arī citos pētījumos tika parādīts, ka NF-κBp65 ekspresija elpceļu epitēlija šūnās HOPS pacientiem ir izteiktāka, salīdzinājumā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem (Yagi, 2006).

Szulakowski et al. konstatēja, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem I-κBa ekspresija ir izteikti samazināta, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem.

Turklāt, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem ir palielināta NF-κBp65 translokācija kodolā, kas pozitīvi korelēja ar izsmēķētājiem pakgadiem. Interesanti, ka AP-1 (aktivētājproteīna-1) ekspresija nebija atšķirīga starp asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem (Szulakowski, 2006). *Lee et al.* parādīja, ka IL-1β aktivē NF-κB signālceļu (Lee, 2006).

Mūsu pētījumā novērojām, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem ir raksturīga NF-κBp65 kodola lokalizācija centrālo un perifēro elpceļu epitēlijšūnās un makrofāgos. Tas liecina par to, ka tabakas dūmi *per se* spēj aktivēt NF-κB šajās šūnās.

Tabakas dūmi ir bagātīgs oksidantu avots. Tie satur vairākus komponentus: dūmu darvas komponentu un gāzes komponentu (MacNee, 1999; Rahman, 2000). Tabakas dūmu darvas komponents satur hinona-hidrohinona reducēšanās oksidēšanās kompleksu, kas reducē O₂ par O₂^{•-}, savukārt, tabakas dūmu gāzes komponents vienā cigaretē satur vairāk kā 10¹⁶ organisko radikāļu (Lannan, 1994; MacNee, 1999). Tie, galvenokārt, ir oglekļa un slāpekļa radikāļi, kā arī alkēni un diēni.

Līdzīgi kā *Di Stefano et al.* pētījumā, mūsu darba rezultāti liecina, ka centrālajos elpceļos NF-κB ir aktivēts epitēlija šūnās (Di Stefano, 2002). Savukārt, analizējot literatūru, netika atrasti darbi, kuros būtu pētīta perifēro elpceļu epitēlija šūnu NF-κB ekspresija. Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka smēķētājiem arī perifēro elpceļu epitēlijšūnās, NF-κB ir aktivēts. *Yagi et al.* konstatēja, ka IκBa pozitīvu šūnu skaits perifēro elpceļu epitēlijā HOPS pacientiem ir būtiski

augstāks, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem (Yagi, 2006). Palielināts IκBα līmenis norāda uz pastiprinātu NF-κB aktivāciju.

Caramori et al. apraksta, ka HOPS paasinājuma laikā inducētajās krēpās NF-κBp65 lokalizācija kodolā ir novērojama makrofāgos nevis neitrofilajos leukocītos (Caramori, 2003). Arī mūsu pētījumā NF-κBp65 lokalizācija neitrofilo leukocītu kodolos netika atrasta.

Eksperimentos ar dzīvniekiem ir parādīts, ka tabakas dūmu ekspozīcija izraisa iekaisuma reakcijas plaušās un sekojošu NF-κB aktivāciju makrofāgos un epitēlija šūnās, proiekaisuma citokīnu sintēzi, palielina histonu acetilēšanu, bet samazina histonu deacetilēšanu, kā arī aktivē MAP kināzes (Marwick, 2004; Nishikawa, 1999).

Analizējot pārmaiņas plaušās pēc smēķēšanas pārtraukšanas, tika novērota samazināta NF-κB kodola translokācija alveolārajos makrofāgos, lai gan, tajā pašā laikā, tika konstatēta palielināta IκBα noārdīšanās. Šis, sākumā pārsteidzošais, fakts ir skaidrojams ar to, ka iekaisuma citokīni var tikt aktivēti arī bez NF-κB līdzdalības. Svarīga nozīme ir peroksisomu proliferācijas aktivētājreceptoriem, *PRAP* (Mishra, 2004). Notiek netiešā mijiedarbība starp *PRAPα* ar cJun un p65. Tādējādi, samazināta NF-κB translokācija ir saistāma nevis ar NF-κB inhibēšanu, bet gan ar inaktivāciju.

Vairākos pētījumos ir konstatēts, ka HOPS pacientiem NF-κB aktivācija novērojama ne tikai plaušu audos, bet arī citos audos, piemēram, skeleta muskulatūras šūnās NF-κBp65 ekspresija ir palielināta. Šādas pārmaiņas korelē ar samazinātu ķermeņa svaru (Agusti, 2004).

Mūsu iepriekšējie pētījumi liecina, ka anti-HIV preparāti izraisa palielinātu NF-κBp65 ekspresiju sirds audos, kas saistīts ar mitohondriju oksidatīvo procesu pieaugumu, savukārt, mildronāts samazina NF-κBp65 ekspresiju (Klusa, 2006; Isajevs, 2007; Pupure, 2008).

Pētījuma rezultāti liecina, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem HDAC2 pozitīvo šūnu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos ir samazināts, salīdzinājumā ar nesmēķētājiem.

Galvenās šūnas, kuras ekspresē HDAC2, ir epitēlija šūnas, makrofāgi un limfocīti. Savukārt, analizējot HDAC2 nokrāsošanās intensitāti ar hromogēnu, konstatējām, ka gan asimptomātiskajiem smēķētājiem, gan HOPS pacientiem HDAC2 aktivitāte centrālo un perifēro elpceļu epitēlijā un alveolārajos makrofāgos ir būtiski samazināta, salīdzinot ar nesmēķētājiem. Tādējādi mūsu rezultāti liecina, ka HDAC2 ir nomākta elpceļu epitēlijā un alveolārajos makrofāgos gan asimptomātiskajiem smēķētājiem, gan HOPS pacientiem.

Turklāt, perifērajos elpceļos HOPS pacientiem HDAC2 aktivitāte izteiktāk nomākta, salīdzinot ar centrālajiem elpceļiem. Iepriekšējie pētījumi liecina, ka tabakas dūmi nomāc HDAC2 aktivitāti alveolārajos makrofāgos un centrālo elpceļu epitēlija šūnās (Ito, 2001). Taču līdz šim netika pētīts, vai HDAC2 ekspresija centrālajos elpceļos ir saistīta ar to ekspresiju perifērajos elpceļos.

Szulakowski et al. pētījuma dati liecina, ka nav atšķirību starp kodola HDAC2 līmeni asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem, lai gan HOPS pacientiem ir izteikti samazināts citoplāzmatisks HDAC2 līmenis un novērota pozitīva korelācija starp HDAC2 un elpceļu obstrukciju (Szulakowski, 2006). Tas, savukārt, korelē ar pastiprinātu acetilētu H3 un H4 līmeni (Szulakowski, 2006).

Mūsu pētījumā, analizējot elpceļu epitēlija šūnu HDAC2 krāsošanās intensitāti, novērojām, ka kodola HDAC2 līmenis centrālajos un perifērajos elpceļos ir samazināts gan HOPS pacientiem, gan asimptomātiskajiem smēķētājiem. Šo atšķirību starp mūsu un *Szulakowski et al.* pētījumu varētu skaidrot ar dažādām pētījumā izmantotajām metodēm. *Szulakowski et al.* izmantoja *western blot* metodi, lai noteiktu kopējo citoplāzmatiskā vai kodola HDAC2 līmeni, bet mūsu pētījuma HDAC2 ekspresija tika analizēta dažādās šūnās ar imūnhistoķīmisko metodi. Līdzīgi arī citos pētījumos ir parādīts, ka HDAC2 ekspresija ir samazināta HOPS pacientiem (To, 2004). Dzīvnieku modeļos parādīts, ka tabakas dūmu ekspozīcija samazina HDAC2 ekspresiju alveolārajos makrofāgos (Marwick, 2004).

Mūsu pētījumā novērojām korelāciju starp HDAC2 ekspresiju un elpceļu obstrukcijas rādītājiem un izsmēķētājiem pakgadiem. Savukārt, mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka tabakas dūmi nomāc HDAC2 aktivitāti ne tikai centrālo elpceļu epitēlijā un alveolārajos makrofāgos, bet arī perifēro elpceļu epitēlijā.

HDAC2 nomāc NF- κ B aktivāciju, deacetilējot histonus un izraisot DNS saritināšanos. HDAC2 aktivitātes samazināšanās uztur NF- κ B aktivāciju un ar to saistīto gēnu ekspresiju, kas palielina tādu iekaisuma citokīnu līmeni kā TNF- α un IL-8 (Barnes, 2000, 2005).

In vitro novērots, ka teofilīns seškārtīgi palielina HDAC2 aktivitāti alveolārajos makrofāgos HOPS pacientiem un palielina deksametazona pretiekaisuma darbību (Cosio, 2004; Ito, 2002). HDAC2 nomākšana ir saistīta ar oksidatīvu stresu, ko izraisa, peroksinitrīti, NO un skābekļa brīvie radikāļi (Barnes, 2005).

Aktivējoties NF- κ B, palielinās arī histonu acetiltransferāžu aktivitāte un peroksīdu koncentrācija, kas inducē histona H4 acetilēšanu un HDAC2 lizīna atlieku nitrozilēšanu (Barnes, 2005).

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti parāda, ka CD8 limfocītu infiltrācija centrālajos un perifērajos elpceļos ir izteiktāka HOPS pacientiem nekā asimptomātiskajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem.

Pētījumā tika konstatēta negatīva korelācija starp FEV₁% un CD8 limfocītu skaitu centrālajos un perifērajos elpceļos.

Arī citos pētījumos ir konstatēts, ka CD8 limfocītu skaits centrālajos un perifērajos elpceļos HOPS pacientiem ir lielāks nekā asimptomātiskajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem (Di Stefano, 1996; Lams, 2001; Saetta, 1999; Turato, 2002).

Turklāt, ir arī novērota ticama negatīva korelācija starp CD8 limfocītu skaitu elpceļos un FEV₁% (Lams, 2001; O'Shaughnessy, 1997).

Tomēr nav veikti pētījumi, kuros būtu analizēta gan centrālo, gan perifēro elpceļu infiltrācija ar iekaisuma šūnām nesmēķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem. Turklāt, nav skaidrs, vai iekaisīgās reakcijas centrālajos elpceļos korelē ar izmaiņām perifērajos elpceļos.

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka HOPS pacientiem CD8 limfocītu infiltrācija ir izteiktāka perifērajos, salīdzinot ar centrālajiem elpceļiem. Palielināta CD8⁺ T limfocītu infiltrācija HOPS pacientiem tieši perifērajos elpceļos ir cieši saistīta ar hronisku obstruktīvu bronholītu un plaušu pārstrukturēšanos. Mūsu rezultāti liecina par vadošo CD8 limfocītu nozīmi HOPS patoģenēzē.

T limfocītu hemotaksei plaušās būtiska nozīme ir elpceļu epitēlijam un makrofāgiem, kas izdala limfocītu hemotakses faktorus. No tiem svarīgākie ir CXCR3 un IP-10 (Barnes, 2003). Nonākot antigēnam plaušās, to fagocitē dendrītiskās šūnas, kas pēc tam migrē limfātiskajos mezglos un izraisa CD4⁺ un CD8⁺ T limfocītu proliferāciju.

Mūsu pētījumā tika konstatēts, ka HOPS pacientiem 28% no limfocītu populācijas NF- κ Bp65 atrodas kodolā, kas liecina par to, ka šīs šūnas aktīvi izdala citokīnus. No tiem galvenie ir IL-6, IL-8 un TNF α . Turklāt, CD8 šūnas izdala perforīnus un granzīmus, tādējādi izraisot alveolāro epiteliocītu apoptozi (Finkelstein, 1995; Rahman, 2000). Mūsu pētījuma rezultāti

atbilst *Di Stefano et al.* darba datiem, kurš arī konstatēja, ka 1/3 no limfocītiem raksturīga NF-κBp65 lokalizācija kodolā (*Di Stefano, 2002*).

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti parāda, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem T regulatoro limfocītu skaits centrālajos elpceļos ir būtiski augstāks (ir korelācija ar izsmēķētājiem pakgadiem) salīdzinājumā ar nesmēķētājiem. Savukārt, perifērajos elpceļos HOPS pacientiem konstatējam samazinātu T regulatoro limfocītu skaitu, kas korelēja ar elpceļu obstrukciju.

CD4+CD25+ T regulatoriem limfocītiem ir svarīga nozīme imunoloģiskās tolerances uzturēšanā, kas regulē iekaisuma un imunoloģiskās reakcijas, nomācot T limfocītu aktivitāti. Šo šūnu skaits atbilst 1-3% no CD4+ T limfocītu populācijas, kas cirkulē asinīs un ir sastopami arī audos. CD4+CD25+ T regulatoro limfocītu funkcionālās pārmaiņas vai skaita samazināšanās ir svarīgs stūrakmens autoimūnu reakciju un hroniska iekaisuma attīstībā. Ir pierādīta to nozīme tādu autoimūnu un hronisku slimību etiopatogēnēzē kā reimatoīdais artrīts, Krona slimība, atopiskais dermatīts, astma, alerģiskais rinīts un hronisks tonsilīts (*Dijaco, 2007; Isajevs, 2006*). Pēdējā laikā ir parādīta T regulatoro šūnu nozīme arī vairāku elpošanas sistēmas slimību patogēnēzē. Ir konstatēts, ka šīs šūnas ir samazinātas alerģiska rinīta un astmas pacientiem (*Oosterhout, 2005*). Mūsu iepriekšējie pētījumi parāda, ka T regulatoro šūnu skaits ir samazināts pacientiem ar hronisku tonsilītu, kas korelēja ar pastiprinātu mikroorganismu proliferāciju audos (*Isajevs, 2006*).

Tomēr ir maz zināms par T regulatoro limfocītu nozīmi hroniskas obstruktīvas plaušu slimības (HOPS) etiopatogēnēzē, kā arī nav skaidra Treg šūnu lokalizācija plaušu audos nesmēķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.

Smyth et al. BAL šķidrums novēroja palielinātu T regulatoro limfocītu skaitu gan asimptomātiskiem smēķētājiem, gan smēķētājiem ar HOPS (*Smyth, 2007*).

Turpretī, *Barcelo et al.* konstatēja, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem BAL šķidrums T regulatoro limfocītu skaits ir palielināts, bet HOPS pacientiem- samazināts (*Barcelo, 2008*).

Lee et al. raksta, ka pacientiem ar emfizēmu ir samazināts Treg limfocītu skaits plaušās, kas korelēja ar FOXP3 mRNS ekspresiju (*Lee, 2007*).

Šos pretrunīgos pētījumu datus, mūsaprāt, varētu skaidrot ar atšķirīgu Treg izvietojanos centrālajos un perifērajos elpceļos, turklāt, nevar izslēgt smēķēšanas ilguma ietekmi uz Treg populāciju. Līdz šim netika veikti pētījumi, kuros būtu analizēts T regulatoro šūnu skaits

centrālajos un perifērajos elpceļos nesmēķētājiem, asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.

Mūsu pētījuma rezultāti apstiprina citu pētnieku nesen iegūtos rezultātus un paplašina tos, parādot, ka T regulatoro šūnu skaits centrālajos elpceļos asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem ir palielināts, bet perifērajos elpceļos HOPS pacientiem novērojama T regulatoro šūnu skaita samazināšanās, kas korelē ar elpceļu obstrukciju.

Palielināts Treg limfocītu skaits centrālajos elpceļos gan HOPS pacientiem, gan, it īpaši, asimptomātiskajiem smēķētājiem, sākumā šķiet pārsteidzošs. Taču tas ir saskaņā ar fizioloģisko audu aizsargreakciju pret tabakas dūmu komponentu izsauktiem bojājumiem.

Palielināts Treg limfocītu skaits ir atbildes reakcija, kas samazina tabakas dūmu izraisīto iekaisumu plaušu audos (Cosio, 2004; Baraldo, 2008).

Vienlaicīgi HOPS pacientu perifērajos elpceļos novērojām samazinātu T regulatoro limfocītu skaitu. Līdz ar to aktualizējās jautājums, kāpēc HOPS pacientiem centrālajos elpceļos T regulatoro šūnu skaits ir palielināts, bet perifērajos elpceļos- samazināts.

Mūsaprāt, šo atšķirību starp dažāda kalibra elpceļiem varētu skaidrot ar to, ka antigēni vai to epitopi var atšķirties centrālajos un perifērajos elpceļos. Centrālajos elpceļos tie pamatā varētu būt tabakas dūmu komponenti, bet perifērajos elpceļos-elastīna vai endotēlija sadales produkti. Šo mūsu hipotēzi apstiprina pēdējos pētījumos iegūtie rezultāti, kuros parādīts, ka HOPS pacientiem ir novērojamas antivielas pret elastīnu un endotēliju (Lee, 2007, Taraseviciene-Stewart, 2005).

Turklāt, ir parādīts, ka HOPS pacientiem perifērajos elpceļos ir samazināts elastisko šķiedru daudzums, kas korelē ar elpceļu obstrukciju (Black, 2008).

Pēdējo gadu pētījumi ļauj izvirzīt hipotēzi, ka HOPS patoģenēzē varētu būt iesaistīta gan iegūtā, gan iedzimtā imunitāte, kā arī autoimūnie procesi, respektīvi, HOPS varētu aplūkot kā slimību ar autoimūnu komponenti (Cosio, 2004; Lee, 2007).

Tādējādi, smēķēšanas izraisītu audu bojājumu, no autoimūnās teorijas viedokļa, varētu aplūkot šādi: tabakas dūmi sekmē proteolītisko enzīmu, tajā skaitā, elastāzes un matricas metaloproteāžu (MMP-9, MMP12), atbrīvošanos no iedzimtās imunitātes šūnām, galvenokārt, no makrofāgiem un neitrofilajiem leukocītiem, kas rada plaušu elastiskā karkasa noārdīšanos. Kamēr elastolīze ir maz izteikta tā slimību neizraisa. Taču, ilgstoša ekspozīcija rada elastolīzes produktu

uzkrāšanos, kurus fagocītē antigēna prezentējošās šūnas un prezentē T limfocītiem, saistībā ar MHC II klases molekulām.

T limfocīti, savukārt, var aktivēt B limfocītus. Ja Treg šūnu populācija ir samazināta vai nomākta, tad Th1 šūnas nekontrolēti vairojas un izdala virkni citokīnu un hemokīnu, tādus kā IFN- γ , CXCL-10 un CXCL-9. CXCL-9 un CXCL-10 aktivē CXCL3, kas rada pastiprinātu MMP-12 atbrīvošanos (Lee, 2007; Isajevs, 2009). Šo hipotēzi apstiprina arī pētījuma dati, kas liecina par to, ka, atmetot smēķēšanu, iekaisums plaušās saglabājas (Chung, 2008). Tas varētu būt saistīts ar autoimūno procesu attīstību un sekojošu persistējošu iekaisumu.

Autoimunitātes hipotēzi apstiprina vairāki pētījumi, kuros konstatētas antielastīna un antiepitēlija antivielas, kas vērstas pret plaušu audu struktūrām (Lee, 2007; Feghali, 2008). Antiepiteliālās antivielas ir mērķētas pret alveolāro epitēliju un endotēliju, un pastarpina antivielu atkarīgo šūnu citotoksicitāti.

Eksperimentos ar dzīvniekiem ir konstatēts, ka humorālai imunitātei un CD4+ T limfocītiem ir svarīga nozīme emfizēmas attīstībā. Tika parādīts, ka pelēm kas imunizētas ar ksenogēnām endotēlija šūnām, veidojas antivielas pret endotēliju un attīstās plaušu emfizēma (Taraseviciene-Stewart, 2005).

Elpceļu epitēlija šūnām ir svarīga nozīme imunoloģisko reakciju uzturēšanā, veidojot tā saucamos „bīstamos signālus”. Bīstamie signāli rodas kā atbildes reakcija uz tabakas dūmos esošiem brīvajiem radikāļiem, ko savā teorijā apraksta *Matzinger*. Plaušās šūnu nekrozes un apoptozes rezultātā, veidojas jauni, modificēti proteīni (piemēram, desmozīni), kurus atpazīst imūnkompetentas šūnas (Matzinger, 2002).

Ir konstatēts, ka HOPS pacientiem plaušu audos biežāk sastopami limfātiskie folikuli, un tajos esošie B-limfocīti ir oligoklonāli, kas var sintezēt antivielas pret tabakas dūmu un ekstracelulārās matricas komponentiem (Van der Strate, 2006). Tajā pašā laikā ir parādīts, ka HOPS pacientiem centrālajos elpceļos ir palielināts B limfocītu daudzums (Gosman, 2006).

Līdzīgi *Lee et al.* savā pētījumā parādīja, ka emfizēmai ir raksturīga Th1 šūnu aktīva atbilde un pacientiem ar emfizēmu asinīs var konstatēt anti-elastīna antivielas (Lee, 2007). *Di Stefano et al.* piedāvā T šūnu aktivācijas modeli (Di Stefano, 2004). Pēc antigēna nonākšanas organismā to atpazīst un fagocītē dendrītiskās šūnas un tālāk prezentē uz savas virsmas. Pēc tam notiek T-šūnu receptora un MHC II mijiedarbība, naīvie T limfocīti aktivējas un izdala IL-2, un pēc dažām dienām migrē no limfmezgla uz plaušām (Di Stefano, 2002; Di Stefano, 2004).

Tradicionāli ir pieņemts uzskatīt, ka HOPS ir raksturīga Th1 šūnu proliferācija (Turato, 2002), taču pēdējo pētījumu dati liecina arī par Th2 limfocītu nozīmi HOPS patoģenēzē (Barnes, 2003).

Ir zināms, ka Th1 šūnas sintezē interleikīnu-2 (IL-2) un interferonu- γ (IFN- γ), nosakot klasiskās imūnās atbildes reakcijas pret intracelulāriem organismiem un vēlīnā tipa alerģiskās reakcijas. Turpretī, Th2 šūnas alerģēnu ietekmē izdala IL-4 un IL-5, kas, savukārt, veicina alerģiskā iekaisuma attīstību un IgE sintēzi. Diferencētas imūnās sistēmas gadījumā, atopiskam indivīdam atbildes tips atkarīgs no antigēna, un viens no imūnās atbildes tipiem neaizkavē otra tipa imūnās reakcijas attīstību.

Th2 šūnas, savukārt, izdala bioloģiski aktīvas vielas, kas nodrošina turpmāko alerģiskās reakcijas kaskādes norisi. Th2 limfocīti izdala granulocītu makrofāgu kolonijas stimulējošo faktoru (GM-CSF), IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, tumoru nekrozes faktoru- α (TNF- α), kuri koordinē turpmāko alerģiskā iekaisuma norisi. IL-4 un IL-13, galvenokārt, iedarbojoties uz B-limfocītiem, veicina IgE sintēzi.

Savukārt, GM-CSF un IL-5 veicina iekaisuma šūnu, tajā skaitā, eozinofilo leukocītu diferencēšanos, aktivāciju un apoptozes aizkavēšanos (Chung, 2008).

Plaušās antigēnu prezentējošās šūnas - makrofāgi un endoteliocīti saistās ar TCR un sekmē IL-12 sintēzi, un sekojošu STAT-4 un IFN γ aktivāciju T limfocītos (Di Stefano, 2004).

Di Stefano et al. ir parādījis, ka HOPS pacientiem STAT-4 un IFN- γ ir aktivēts centrālajos elpceļos (Di Stefano, 2004). Pēc CD4+ T limfocītu stimulācijas aktivējas arī CD8+ T limfocīti, turklāt, to aktivācijai ir nepieciešama mijiedarbība ar CD4+ T limfocītiem. Ir arī iespējama paralēla dendrītisko šūnu antigēna prezentācija gan CD4+, gan CD8+ T limfocītiem. Antigēna apstrādē nozīme ir karstuma šoka proteīniem (Chung, 2008).

Savukārt, CD8+ T limfocītus var aktivēt antigēns kompleksā ar MHC I molekulām, iesaistot proteosomas signālmehānismu (Cosio, 2004). Pēc CD8+ T limfocītu aktivācijas to klonālā ekspansija notiek intensīvāk, kas izskaidro faktu, kāpēc CD8+ T limfocītu plaušu audos ir vairāk nekā CD4+ T limfocītu (Agusti, 2003; Cosio, 2004).

Mūsu pētījumā konstatējām, ka neitrofilo leukocītu infiltrācija HOPS pacientiem gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos ir izteiktāka nekā asimptomātiskajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem. Līdzīgi rezultāti ir iegūti arī citos pētījumos (Di Stefano, 1996; Lacoste, 1993; Lams, 2000; Saetta, 1994).

Mūsu pētījuma rezultāti apstiprina arī *Pesci et al.* pētījuma rezultātus, kurš novēroja palielinātu neitrofilo leukocītu skaitu HOPS slimnieku bronhu gļotādas epitēlijā un subepitēliālajā slānī (*Pesci, 1998*).

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka neitrofilo leukocītu skaits perifērajos elpceļos HOPS pacientiem ir būtiski lielāks nekā nesmēķētājiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem. Šie dati apstiprina *Bosken et al.* (1992) pētījuma datus, bet ir pretstatā *Saetta et al.* (1998) datiem, kurš neatrada būtiskas neitrofilo leukocītu skaita atšķirības.

Mūsu dati liecina, ka HOPS pacientiem neitrofilo leukocītu infiltrācija perifērajos elpceļos ir izteiktāka, nekā centrālajos elpceļos. Mūsu rezultātus apstiprina arī bronhoalveolārās lavāžas materiāla pētījumi, kur galvenās iekaisuma šūnas ir neitrofilie leukocīti (*Rutgers, 2000; Thompson, 1989*).

Atšķirības pētījumos, mūsaprāt, varētu tikt izskaidrotas šādi. Pirmkārt, un galvenokārt, tas ir atkarīgs no tā, kurās elpceļu struktūrās tika skaitītas šūnas.

Mūsu pētījumā šūnas tika skaitītas epitēlijā un subepitēlijā, jo tie ir galvenie slāņi, kuros novēro iekaisuma šūnu infiltrāciju, un šī šūnu skaitīšanas metode ir vispārpieņemta. Otrkārt, šūnu infiltrāciju var ietekmēt arī citi faktori, piemēram, smēķēšanas ilgums. Mūsu pētījumā nebija atšķirības starp smēķēšanas ilgumu asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem, kas izslēdz smēķēšanas ilguma ietekmi uz iekaisuma šūnu infiltrācijas intensitāti.

Mūsu pētījumā, līdzīgi kā citos darbos, konstatējām negatīvu korelāciju starp neitrofilo leukocītu skaitu centrālajos elpceļos (*Lams, 2000*) un perifērajos elpceļos (*Bosken, 1992*), un elpceļu obstrukcijas rādītājiem- $FEV_1\%$ un $FEV_1/FVC\%$. Līdzīgi kā *Bosken et al.* pētījumā, konstatējām pozitīvu korelāciju starp neitrofilo leukocītu skaitu perifērajos elpceļos un izsmēķētājiem pakgadiem (*Bosken, 1992*).

HOPS pacientu krēpās un asinīs cirkulējošajos neitrofilajos leukocītos ir palielināta leukocītu specifisko integrīnu CD11b/CD18 ekspresija (*Yamagata, 2007*), bet asinīs neitrofilajiem leukocītiem piemīt samazināta hemotakse un migrācija pret N-formil-metionil-leicil-fenilalanīnu un IL-8 (*Yoshikawa, 2007*).

Tabakas dūmos esošie ekstrakti nomāc neitrofilo leukocītu fagocitārās īpašības, samazinot tajos kaspāzes-3 aktivitāti, tā rezultātā netiek nomākta spontāna apoptoze (*Stringer, 2007*). Pētījumos *in vitro* konstatēts, ka tabakas dūmos esošo skābekļa radikāļu ietekmē samazinās neitrofilo leukocītu spēja deformēties, kā arī palielinās brīvo radikāļu izdalīšanās no pašiem

neitrofilajiem leukocītiem, kas, iespējams, ir viens no iemesliem, kāpēc šīs šūnas uzkrājas smēķētāju elpceļos (Drost, 1992).

Mūsu pētījumā parādījām, ka HOPS pacientiem neitrofilo leukocītu infiltrācija ir izteiktāka perifērajās, salīdzinājumā ar centrālajiem elpceļiem. Neitrofilo leukocītu pastiprināta infiltrācija HOPS pacientiem tieši perifērajās nevis centrālajās elpceļos, mūsuprāt, ir īpaši svarīga HOPS patoģenēzē.

Ir zināms, ka neitrofilie leukocīti spēj izdalīt skābekļa brīvos radikāļus. Neitrofilo leukocītu mieloperoksidāze katalizē H_2O_2 reakciju ar Cl^- (hlorā joni), kā rezultātā veidojas HOCl (hipohlorskābe), kas ir ļoti spēcīgs oksidants (Rahman, 2000).

Pētījumos *in vitro* konstatēts, ka neitrofilo leukocītu proteāzes-elastāze, kolagenāze, neitrofilo leukocītu katepsīns-G izraisa spēcīgu epitēlija atslāņošanu no bronhu bazālās membrānas (Keatings, 1997).

Savukārt, neitrofilo leukocītu elastāze ir svarīgs elastīnu šķeļošs proteolītiskais enzīms, kas bojā plaušu elastisko karkasu, tādējādi sekmējot emfizēmas un HOPS attīstību. Turklāt ir pierādīts, ka HOPS pacientiem ir samazināts elastisko šķiedru daudzums perifērajās elpceļos, kas korelē ar elpceļu obstrukciju (Black, 2008).

Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka makrofāgu absolūtais skaits centrālajos elpceļos ir būtiski augstāks HOPS pacientiem nekā nesmēķētājiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem. Līdzīgi rezultāti ir iegūti arī citos pētījumos (Di Stefano, 1996; Rutgers, 2000).

Savukārt, daži pētnieki neatrada būtiskas atšķirības starp makrofāgu skaitu centrālajos elpceļos HOPS pacientiem un nesmēķētājiem (Lams, 2001; Saetta, 1994).

Mūsu pētījumā makrofāgu skaits perifērajās elpceļos HOPS pacientiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem izrādījās būtiski augstāks nekā nesmēķētājiem. Turklāt, tika konstatēta negatīva korelācija starp makrofāgu skaitu centrālajos un perifērajās elpceļos un $FEV_1\%$. Līdzīgi *Finkelstein et al.* pētījuma datiem, arī mūsu darbā tika konstatēts, ka makrofāgu infiltrācija plaušu audos bija izteiktāka asimptomātiskajiem smēķētājiem nekā nesmēķētājiem (Finkelstein, 1995).

Palielināts makrofāgu skaits ir saistīts ar palielinātu monocītu migrāciju plaušu audos, hemotakses faktoru ietekmē. Starp tiem svarīga nozīme ir MCP-1 (monocītu hemotakses faktors) un CXC hemokīnam (Barnes, 2003). Ar tabakas dūmiem aktivētie alveolārie makrofāgi izdala vairākus neitrofilo leukocītu hemotakses faktorus, piemēram, IL-8, LTB-4. Kā norāda

Nishikawa et al. tas, iespējams, ir tabakas dūmos esošā superoksīda atkarīgs process, kas, ar NF- κ B aktivācijas starpniecību, izraisa IL-8 ekspresiju makrofāgos (Nishikawa, 2001).

Aktivētie makrofāgi būtiski palielina IL-1 β , IL-6, IL-8 un TNF α izdalīšanos, tādējādi veicinot iekaisuma procesu attīstību plaušās (Barnes, 1997; Rahman, 2000).

Aktīvi makrofāgi spēj izdalīt vairākus oksidantus, piemēram, hidroksila radikāli. Šīm šūnām ir būtiska nozīme plaušu emfizēmas un fibrozes attīstībā. Makrofāgi pastiprināti izdala arī virkni citu iekaisuma mediatoru, piemēram, IP-10 (interferona γ indukcijas proteīns), GRO- α (augšanas faktora līdzīgais onkogēns α), monokīnu inducētais interferons γ (Mig) un interferonu inducētais T šūnu hemotakses faktors (I-TAC), kā arī matricas metaloproteināzes, MMP, īpaši MMP-9 un MMP-1. Šie fermenti un mediatori veicina hroniska iekaisuma veidošanos elpceļos un plaušu audu pārstrukturēšanos.

Iegūtie rezultāti liecina par to, ka no tabakas dūmiem izdalītie oksidanti *per se* aktivē alveolāros makrofāgus un to NF- κ B.

Aktivētie makrofāgi sintezē virkni iekaisuma citokīnu, piemēram, IL-1 β , IL-6, IL-8 un TNF α , kas izraisa iekaisuma procesu plaušās (Barnes, 1997; Rahman, 2000).

Svarīgi arī tas, ka aktivētie makrofāgi paši izdala vairākus oksidantus, piem., makrofāgos no O₂ dzelzs jonu klātbūtnē veidojas hidroksila radikālis OH. Makrofāgiem ir būtiska nozīme plaušu emfizēmas un fibrozes attīstībā. Makrofāgu metaloproteināzes sagrauj plaušu audu elastisko karkasu, tādējādi veicina emfizēmas attīstību, bet TGF- β un PAF izraisa fibrozi (Saetta, 2001).

Pētījumā iegūtie rezultāti, parāda, ka HOPS pacientiem makrofāgu infiltrācija ir izteiktāka centrālajos nevis perifērajos elpceļos, kas sākumā liekas pārsteidzoši. Taču, tajā pašā laikā, tas ir skaidrojams ar šūnu migrācijas īpatnībām, atkarībā no asinsvada kalibra blakus esošajās struktūrās un lokālās citokīnu un hemokīnu koncentrācijas.

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti norāda, ka pastāv atšķirības starp iekaisuma šūnu infiltrāciju centrālajos un perifērajos elpceļos. Tā, HOPS pacientiem neitrofilo leikocītu un CD8+ T limfocītu infiltrācija ir izteiktāka perifērajos, nekā centrālajos elpceļos, bet, savukārt, makrofāgu infiltrācija ir izteiktāka centrālajos, salīdzinājumā ar perifērajiem elpceļiem.

Šo atšķirīgo iekaisuma šūnu infiltrāciju elpceļos varētu izskaidrot divējādi. Pirmkārt, citokīnu koncentrācija varētu būt atkarīga no elpceļu kalibra, otrkārt, šūnu piesaistīšanās varbūt atkarīga no asinsvadu kalibra. Tā, piemēram, dzīvnieku modeļos, parādīts, ka citokīnu un hemokīnu

ekspresija plaušu distālajās daļās ir lielāka nekā proksimālajās daļās, savukārt, CD4+ T limfocīti, galvenokārt, infiltrē centrālos elpceļus (Miller, 2005).

Tiek uzsvērts, ka plaušu perifērie elpceļi ir atbildīgi par imūnsistēmas efektoro šūnu mobilizāciju, savukārt, centrālajos elpceļos tās uzkrājas kā rezervuārs hroniskam iekaisumam. *Ainslie et al.* norāda, ka limfocītiem ir tendence vairāk piestiprināties pie bronhu epitēlija, nevis pie alveolārā epitēlija (Ainslie, 2002).

Pēdējos pētījumos uzsvērts, ka limfocīti, galvenokārt, migrē plaušās cauri bronhiālajiem asinsvadiem, bet neitrofilie leukocīti - caur postkapilārajām pulmonārajām venulām (Pabst, 2002).

Apkopojot, mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka smēķēšana rada hronisku iekaisumu gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos. HOPS pacientiem iekaisīgās pārmaiņas (palielināta NF- κ Bp65 ekspresija, makrofāgu, CD8+ T limfocītu un neitrofilo leukocītu infiltrācija, bet samazināta HDAC2 ekspresija) ir izteiktākas, salīdzinājumā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem, un tās pamatā ir novērojamas perifērajos elpceļos. Turklāt, iekaisuma regulācijā svarīga nozīme ir T regulatorajiem limfocītiem, kuru daudzums ir samazināts HOPS pacientu perifērajos elpceļos, kas korelē ar elpceļu obstrukciju.

Pētījuma novitāte, priekšrocības un darba zinātniskā nozīme

Salīdzinot šo darbu ar publicētajiem pētījumiem, var secināt, ka tam ir vairākas nozīmīgas priekšrocības.

1. Līdz šim pasaules zinātniskajā medicīnas literatūrā (tai skaitā *PubMed/Index Medicus*) nav datu par pētījumiem, kuros asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem salīdzinātu iekaisuma šūnu infiltrāciju un nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65), kā arī otrā subtipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresiju gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos.

Mūsu pētījuma rezultāti parāda, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem ir raksturīgs iekaisums centrālajos un perifērajos elpceļos, tomēr HOPS pacientiem iekaisīgās pārmaiņas ir izteiktākas gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos.

Darbā novērojām nevienmērīgu iekaisuma šūnu infiltrāciju centrālajos un perifērajos elpceļos. HOPS pacientiem un asimptomātiskajiem smēķētājiem neitrofilo leukocītu un CD8 limfocītu infiltrācija bija izteiktāka perifērajos elpceļos nekā centrālajos elpceļos, bet makrofāgu infiltrācija HOPS pacientiem bija izteiktāka centrālajos nekā perifērajos elpceļos.

2. Pētījumā parādījām, ka HDAC2 ekspresija HOPS pacientiem ir izteikti samazināta perifēro elpceļu epitēlijšūnās un makrofāgos, tādējādi paverot HOPS farmakoloģisko preparātu jaunu izpēti virzienu, kas palielinātu HDAC2 aktivitāti.

3. Pētījumā tika iekļauts liels pacientu skaits ($n = 72$), kas būtiski palielina statistisko rezultātu ticamību.

4. Būtiska pētījuma prioritāte ir tā, ka starp pētījumā iekļautajām pacientu grupām – asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem – nebija statistiski ticamas atšķirības izsmēķēto pakgadu skaitā. Tas noliedz smēķēšanas ilguma ietekmi uz iegūtajiem datiem. Starp trijām pētījumā iekļautajām grupām (nesmēķētāji, asimptomātiskie smēķētāji un HOPS pacienti) nebija statistiski ticamas antropometrisko parametru (svars, augums, vecums) atšķirības. Pacientiem arī netika konstatētas atšķirības starp audzēja histoloģisko formu.

5. Visi pētījuma preparāti tika analizēti, iekļaujot gan pozitīvo, gan negatīvo kontroli. Turklāt visi preparāti tika analizēti gan vizuāli, gan ar datorprogrammas palīdzību, kas paaugstināja rezultātu ticamību.

6. Būtisks ir novērojums, ka asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem centrālajos elpceļos T regulatoro limfocītu skaits ir palielināts un korelēja ar izsmēķētajiem pakgadiem, bet

perifērajos elpceļos HOPS pacientiem Treg šūnu skaits ir samazināts un korelēja ar elpceļu obstrukciju. Tas norāda uz traucētu imūno procesu perifēro regulāciju.

Atklājums, ka HOPS pacientiem perifērajos elpceļos ir samazināts T regulatoro limfocītu skaits, paver jaunu HOPS farmakoloģisko preparātu izpētes virzienu, kura mērķis ir veicināt T regulatoro limfocītu proliferāciju un aktivāciju.

Pētījuma iespējamie trūkumi

Viens no iespējamajiem pētījuma trūkumiem ir tas, ka izmantojam operāciju materiālu no pacientiem, kas tika operēti, sakarā ar solitāru perifēro veidojumu plaušās (nesīkšūnu audzēju).

Lai mazinātu iespējamās audzēja izraisītās pārmaiņas pētāmajos audos, materiāls (subpleirāls plaušu parenhīmas gabals un segmentārs bronhs) tika ņemts pēc iespējas tālāk no audzēja lokalizācijas vietas, respektīvi, tuvu rezekcijas līnijām.

Pētījumā tika iekļauta arī kontroles pacientu grupa ar solitāru plaušu audzēju. Jāatzīmē, ka netika atrasta atšķirība starp audzēja histoloģisko formu dažādās pacientu grupās.

Plaušu operāciju materiāls, ko iegūst no pacientiem ar plaušu audzēju, ir vienīgais avots vienlaicīgai centrālo un perifēro elpceļu izmeklēšanai. Ņemot vērā iepriekš minēto, mēs uzskatām, ka pētījuma rezultāti ir ticami un kvalitatīvi.

Pētījumā tika iesaistīti tikai vidēji smagas pakāpes HOPS pacienti. Šāda izvēle pamatojas uz vairāku iepriekš publicētu pētījumu atzinumiem, ka raksturīgākās pārmaiņas ir novērojamas tieši vidēji smagas HOPS pacientu grupai.

Rezultātu klīniskā nozīme

1. Pētījuma rezultāti liecina, ka nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) un 2. tipa histonu deacetilāzes ekspresija, kā arī T regulatoro limfocītu skaits varētu būt kritērijs HOPS ārstēšanas efektivitātes un prognozes novērtēšanā. Šos rādītājus klīnikā var noteikt, izmantojot mazinvas metodes, piemēram, krēpu indukciju.
2. HOPS ārstēšanā perspektīvi varētu kļūt medikamenti, kas nomāktu NF- κ Bp65 ekspresiju, bet palielinātu HDAC2 ekspresiju un T regulatoro limfocītu aktivitāti.

Hipotēzes attīstība nākotnē

Nākotnē tiek plānots noskaidrot citu HDAC apakštipu nozīmi HOPS patoģenēzē, kā arī analizēt šo vielu ekspresiju un T regulatoro limfocītu skaitu inducētajās krēpās. Tādējādi varētu izstrādāt ātru un neinvazīvu metodi HOPS diagnostikai, slimības gaitas prognozēšanai un ārstēšanas efektivitātes novērtēšanai.

8. Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

1. Asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem ir raksturīgas iekaisuma reakcijas centrālajos un perifērajos elpceļos, bet HOPS pacientiem tās ir izteiktākas perifērajos nekā centrālajos elpceļos.
2. Iekaisuma šūnu (makrofāgu, CD8 T limfocītu un neitrofilo leikocītu) spektrs atšķiras centrālajos un perifērajos elpceļos asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem.
3. HOPS pacientiem nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) ekspresija ir palielināta, bet 2. apakštipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresija ir samazināta gan centrālajos, gan perifērajos elpceļos salīdzinājumā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem un nesmēķētājiem, kas korelē ar elpošanas funkcionālajiem rādītājiem un izsmēķētājiem pakgadiem.
4. Asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem centrālajos elpceļos ir palielināts T regulatoro limfocītu skaits, kas korelē ar izsmēķētiem pakgadiem, savukārt perifērajos elpceļos HOPS pacientiem T regulatoro šūnu skaits ir samazināts, kas korelē ar elpošanas funkcionālajiem rādītājiem un norāda uz traucētu imūno procesu perifēro regulāciju.
5. NF- κ Bp65, HDAC2 ekspresija, kā arī T regulatoro limfocītu skaits elpceļos varētu būt HOPS prognozes, diagnozes un ārstēšanas efekta novērtēšanas kritērijs.

9. Secinājumi

1. Asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem ir raksturīgas iekaisīgas izmaiņas centrālajos un perifērajos elpceļos. Par to liecina palielināta nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) ekspresija un iekaisuma šūnu – makrofāgu, CD8, T limfocītu un neitrofilo leikocītu – infiltrācija, bet samazināta otrā tipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresija. Salīdzinājumā ar asimptomātiskajiem smēķētājiem HOPS pacientiem iekaisīgās izmaiņas ir izteiktākas perifērajos elpceļos.
2. Asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem ir raksturīga nevienmērīga iekaisuma šūnu infiltrācija centrālajos un perifērajos elpceļos. Neitrofilo leikocītu un CD8 limfocītu infiltrācija ir izteiktāka perifērajos elpceļos salīdzinājumā ar asimptomātisko smēķētāju un HOPS pacientu centrālajiem elpceļiem. Toties HOPS pacientiem makrofāgu infiltrācija ir izteiktāka centrālajos nekā perifērajos elpceļos.
3. HOPS pacientiem nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) ekspresija ir palielināta, bet 2. tipa histonu deacetilāzes (HDAC2) ekspresija samazināta salīdzinājumā ar asimptomātisko smēķētāju un nesmēķētāju centrālajiem un perifērajiem elpceļiem. Iekaisīgo izmaiņu kritēriji (NF- κ Bp65 un HDAC2 ekspresija) korelē ar elpošanas funkcionālajiem rādītājiem un izsmēķētājiem pakgadiem.
4. Asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem centrālajos elpceļos novēro palielinātu T regulatoro limfocītu skaitu, kas korelē ar izsmēķētājiem pakgadiem un liecina par adaptīvo mehānismu aktivāciju. Savukārt perifērajos elpceļos HOPS pacientiem ir raksturīga T regulatoro šūnu skaita samazināšanās, kas negatīvi korelē ar elpceļu caurlaidību un liecina par adaptīvo perifērās imunitātes mehānismu dekompensāciju.
5. Nukleārā faktora- κ Bp65 (NF- κ Bp65) un 2. tipa histonu deacetilāzes ekspresija, kā arī T regulatoro limfocītu skaits varētu būt kritērijs HOPS ārstēšanas efektivitātes un slimības prognozes novērtēšanā. HOPS ārstēšanā perspektīvi varētu kļūt medikamenti, kas nomāktu NF- κ Bp65 ekspresiju, bet palielinātu HDAC2 ekspresiju un T regulatoro limfocītu aktivitāti.

10. Publikācijas

Publikācijas par promocijas darba tēmu starptautiski citējamās izdevumos (PubMed/Index Medicus)

- 1) **Isajevs S**, Taivans I, Strazda G, Kopeika U, Bukovskis M, Gordjusina V, Kratovska A. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. *Eur Respir J* 2009; 33: 61-67.
- 2) **Isajevs S**, Taivans I, Kratovska A, Strazda G, Kopeika U, Gordjusina V. Different pattern of inflammatory responses in large and small airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Medicina (Kaunas)*, 2009 (iesniegts publikācijai).

Publikācijas starptautiski citējamās izdevumos (PubMed/Index Medicus), kuras ir minētas promocijas darba literatūras apskatā

- 3) Pupure J, **Isajevs S**, Gordjushina V, Taivans I, Rumaks J, Svirskis S, Kratovska A, Dzirkale Z, Pilipenko J, Duburs G, Klusa V. Distinct Influence of Atypical 1,4-Dihydropyridine Compounds in Azidothymidine-Induced Neuro- and Cardiotoxicity in Mice *Ex Vivo*. *Basic Clinical Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 401-406.
- 4) Klusa V, Pupure J, **Isajevs S**, Rumaks J, Gordjushina V, Kratovska A, Taivans I, Svirskis S, Viksna L, Kalvinsh I. Protection of azidothymidine-induced cardiopathology in mice by mildronate, a mitochondria-targeted drug. *Basic Pharmacol Toxicol* 2006; 99(4): 323-328.

Publikācija par promocijas darba tēmu recenzējamās izdevumos

- 5) **Isajevs S**, Taivans I, Kopeika U, Strazda G. Iekaisīgās pārmaiņas centrālajos un perifērajos elpceļos asimptomātiskajiem smēķētājiem un HOPS pacientiem. *Latvijas Universitātes Zinātniskie Raksti, Medicīna*, 2007; 712: 64-75.
- 6) Markovs J, **Isajevs S**, Knipshe G. Immunological tolerance and recurrent tonsillitis. *Eesti Arst*, 2005; 6, 74-76.

7) **Isajevs S**, Markovs J, Zilevica A, Viesturs U, Knipshe G. Diagnostic value of histological and microbiological screening in recurrent tonsillitis. *Bioautomation*, 2006; 5: 49-56.

Kongresu tēzes par promocijas darba tēmu

8. **Isajevs S**, Taivans I, Strazda G, Kopeika U, Bukovskis M, Kratovska A. Influence of cigarette smoking history on FOXP3 expression in smokers with and without COPD. *Histopathology*, 2008; 53(1): 347.

9. **Isajevs S**, Taivans I, Strazda G, Kopeika U. Decreased FOXP3 expression in COPD patients. *Virchows Archiv*, 2007; 451 (2):181.

10. **Isajevs S**, Taivans I, Kopeika U, Strazda G. Influence of cigarette smoking history on HDAC2 expression in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006; 28:190s.

11. **Isajevs S**, Markovs J, Knipshe G, Zilevica A. S-100, CD4+CD25+ expression in patients with recurrent and hypertrophic tonsillitis. *Eur Respir J* 2006; 28: 264s.

12. **Isajevs S**, Taivans I, Kopeika U, Strazda G. Inflammatory cells and HDAC2 expression in peripheral airways of COPD patients. *Mod Pathol* 2006; 119: 167-168.

13. **Isajevs S**, Markovs J, Knipshe G. Possible role of T-regulatory cells in the chronicity of tonsillitis. *Mod Pathol* 2006; 119: 107-108.

14. **Isajevs S**, Taivans I, Kopeika U, Strazda G. Central and peripheral airways expression of NF- κ Bp65 and HDAC2 in COPD. *Virchows Archiv* 2005; 387.

15. Taivans I, **Isajevs S**, Strazda G, Kopeika U. Smēķēšanas izraisītais iekaisuma process centrālajos un perifērajos elpceļos un tā saistība ar HOPS. *4. Pasaules latviešu ārstu kongresa tēžu grāmata*, 2005; 43.

LR Patenti

16) Kluša V, **Isajevs S**, Pupure J, Rumaks J, Gordjušina V, Taivans I., Kalviņš I. Farmaceutiskās kompozīcijas uz apgrieztās transkriptāzes inhibitora un meldonija bāzes. LR patents Nr P-05-95, no 2005.gada, LVA 050950.

17) Kluša V, Pupure J, **Isajevs S**, Rumaks J, Gordjušina V, Taivans I, Svirskis Š, Bisenieks E, Poikans J, Uldriķis J, Duburs G, Vīgante B. 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi kā

antitoksiskas piedevas HIV infekciju ārstēšanas procesā ar azidotimidīnu. Pat.Nr. P-05-154, prioritāte no 29.11.05

Citas starptautiski citētas publikācijas (PubMed/Index Medicus)

18) Berzina N, Markovs J, **Isajevs S**, Apsite M, Smirnova G. Cadmium-induced enteropathy in domestic cocks: biochemical and histological study after subchronic exposure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;101(1): 29-34.

Citas publikācijas recenzējamajos izdevumos

19) **Isajevs S**, Pupure J, Gordjushina V, Kratovska A, Taivans I, Vīksna L, Kalviņš I, Kluša V. Mildronate protects cardiopathy caused by stavudine and lamivudine. *Proc.Latvian Acad. Sci., Section B.*, 2007; 61 (1/2): 26-32

20) Markovs J, **Isajevs S**, Rozentāle B, Knipse G, Svirina S. The EMT phenomenon: special emphasis on analysis of hepatic fibrosis and hemosiderosis. *LU Raksti, Medicīna* 2008; 735: 157-168.

21) **Isajevs S**, Markovs J, Knipse G, Žileviča A. Onkoproteīna BCL-2, citokeratīna 19 un S-100 ekspresija mandeļu šūnās hroniska tonsilīta pacientiem. *Latvijas Universitātes Zinātniskie Raksti, Medicīna*, 2007; 712: 6 40-46.

22) Markovs J, Freda M, **Isajevs S**, Rozentale B, Berzina N, Knipse G. The role of TRPV1 in iron homeostasis-implications to hemosiderosis. *Latvijas Universitātes Zinātniskie Raksti, Medicīna*, 2007;712:6 116-123.

23) **Isajevs S**. Baktēriju un Candida ģints sēņu asociācijas pacientiem ar hronisku tonsilītu. *Latvijas Universitātes Zinātniskie Raksti*, 2004; Medicīna, 668sēj, 59-68.

24) Šavlovskis J, **Isajevs S**, Knipse G. Arteria epigastrica inferior topogrāfiskā anatomija un gaitas atkarība no antropometriskajiem rādītājiem. *Acta Chirurgica Latviensis*, 2004; 2, 21-24.

Tēzes

- 24) Markovs J, **Isajevs S**, Svirina D, Rozentale B, Knipse G. Caspase-3 has nonapoptotic function in Kupffer cell activation. *Histopathology*, 2008; 53(1): 261-262.
- 26) Markovs J, Berzina N, **Isajevs S**, Svirina D, Rozentale B. Caspase-3-dependent cell death in the ileal mucosa: the role of high-dose ascorbic acid. *Abstract book of Apoptosis World 2008*, Luxembourg. 198.
- 27) Sjakste N, Sharipova J, Baumane L, Sjakste T, Dzintare M, **Isajevs S**, Gordjushina V, Salna E, Meirena D, Kalvinsh I. Modifications of NO synthesis by flavonoids in rat organs studied by means of ESR spectroscopy. *Abstract book of 40th annual international meeting of electron spin resonance group*, 2007; 128.
- 28) Knipshe G, Markovs J, **Isajevs S**, Rozentale B., Svirina D. Gender and liver fibrosis in chronic hepatitis C: role of the TGF-beta1. *Virchows Archiv* 2007; Vol.451 (2): 357.
- 29) Klusa V, **Isajevs S**, Klimaviciusa L, Pupure J, Rumaks J, Svirskis S, Duburs G. Antiinflammatory and antiapoptotic action of atypical 1,4-dihydropyridine compounds in neurotoxicity models. *Virchows Archiv* 2007; 451 (2): 239.
- 30) Svirina D, Rozentale B, **Isajevs S**, Knipshe G, Markovs J. Possible role of S100 protein in iron resistance of liver cells. *European Journal of Medical Research* 2007; 12: (4): 170.
- 31) Rumaks J, Pupure J, **Isajevs S**, Gordjusina V, Taivans I, Viksna L, Svirskis Š, Kalvinsh I., Duburs G, Jansone B, Klusa VZ. Comparative studies of cerebrocrast, glutapyrone and mildronate in AZT-induced neurotoxicity in mice. In *Program and Abstracts, EAST-European Symposium Central and Peripheral Synaptic Transmission. Under the Auspices of the IBRO-CEERC and the Fens*, Varna, Bulgaria, October 5-9, 2006: Blachwell Publ. Ltd (P27), 2006; 106.
- 32) Pupure J, **Isajevs S**, Rumaks J, Gordjusina V, Taivans I, Viksna L, Svirskis S, Kalvinsh I, Duburs G, Jansone B, Klusa VZ. Mildronate, cerebrocrast, and glutapyrone as highly active cardioprotectors in the AZT-induced cardiomyopathy in mice. In *Program and Abstracts, EAST-European Symposium Central and Peripheral Synaptic Transmission. Under the Auspices of the IBRO-CEERC and the Fens*, Varna, Bulgaria, October 5-9, 2005: Blachwell Publ. Ltd (P26), 2006; 105.

- 33) Klusa V, **Isajevs S**, Rumaks J, Gordjusina V, Svirskis S, Taivans I, Meirene D, Duburs G, Kalvinsh I. Protective effects of novel drugs in AZT-induced cardiopathology in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27, Suppl 1, 253.
- 34) Markovs J, Knipshe G, **Isajevs S**, Rozentale B, Zilevica A. Immunohistochemical distribution of the TGF-beta in the liver cells of patients with chronic hepatitis C. *Abstract Book of the 4th Asian Pacific International Congress of anatomists*, 2005; 206-7.
- 34) **Isajevs S**, Žileviča A. Microorganisms and viruses as persistent agents in chronic inflammation. *Proc Latvian Acad. Sci Section B* 2004; 58: A11.
- 36) Knipše G, Markovs J, **Isajevs S**, Rozentāle B. IL-2 receptora (CD25) šķīstošās formas loma holestātiskā hepatīta diagnostikā. *5. Latvijas ārstu kongress* 2005; 19-20.
- 37) **Isajevs S**, Markovs J, Zilevica A, Kalnina VI, Zamiatina N. Diagnostic value of cytological, bacteriological and virological screening in patients with chronic tonsillitis. *Clin Microbiol Infect*, 2004; 666.
- 38) **Isajevs S**, Markovs J, Zilevica A. Local immune system and viruses as persistent agents in recurrent tonsillitis. *Abstract book of 22nd Annual Meeting of European Society for Paediatric Infectious Diseases*, 2004; 106.
- 39) **Isajevs S**. Morphofunctional evaluation of palatine tonsils in patients with recurrent tonsillitis. *Abstract book of 11th International Student Congress of Medical Sciences*, 2004; 54.
- 40) **Isajevs S**, Markovs J, Žilēvica A. Aukslēju mandeļu morfofunkcionālais raksturojums pacientiem ar hronisku tonsilītu. *Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes 62.zinātniskās konferences tēžu krājums*, 2004; 24.
- 41) Savlovskis J, **Isajevs S**, Knipshe G. Arteria epigastrica inferior projection on abdominal wall depending on human anthropometrical indices. *Abstract book of 17. International symposium on morphological sciences*, Brumer publishing house, 2002; 281.

11. PATEICĪBA

Pirmkārt, vislielāko pateicību vēlos izteikt saviem vecākiem Tatjanai un Borisam Isajeviem, ar kuru gādību un atbalstu esmu varējis iegūt izglītību, kā arī par izpratni vēlākajos gados. Tāpat paldies visiem mani tuviem cilvēkiem, radiem un draugiem, kas ir pacietuši to, ka laiks, ko labprāt veltītu viņiem, izmantots šā darba tapšanā.

Īpaši vēlos pateikties savam promocijas darba vadītājam prof. I. Taivanam par pozitīvu attieksmi un progresīvu radošo vidi, kas ļāva šīs ieceres īstenot. Viņš atbalstīja manu vēlmi aizsākt plaušu izpēti, izmantojot modernās morfoloģiskās izmeklēšanas metodes.

Paldies mani kolēģiem, kas darba izstrādes laikā mani atbalstīja gan LU Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedrā, gan P. Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā. Īpaši pateicos *Dr. med.* U. Kopeikam, *doc.* G. Strazdai par palīdzību pacientu atlasē, kā arī *Dr. biol.* N. Jurkam par palīdzību datu statistiskajā apstrādē.

Paldies arī mani pirmajiem zinātniskā darba vadītājiem prof. G. Knipšei, prof. A. Žilevičai, prof. J. Markovam, ar kuru palīdzību speru pirmos soļus pētniecībā.

Paldies prof. Renātei Ligerei, *doc.* L. Plakanei un *doc.* G. Strazdai par vērtīgiem padomiem promocijas darba sagatavošanas beigu posmā.

Paldies Darjai Svirinai un kolēģei A. Kratovskai, kuras piedalījās histoloģisko preparātu pagatavošanā un analīzē.

Liels paldies I. Danusevičai un I. Kalviņai par palīdzību darba tapšanas un doktorantūras studiju gaitā.

Paldies arī LU un Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas vadībai par sapratni un radošo vidi.

Šis darbs pamatā tikā veikts ar ESF (Eiropas Sociālā fonda) atbalstu. Savu zinātnisko darbību varēju īstenot, pateicoties Latvijas Zinātņu akadēmijas stipendijai.

Sergejs Isajevs

2009. gada 17. aprīlī

12. LITERATŪRA

1. Abate C, Patel L, Rausher FJ, Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 1990; 249: 1157-1161.
2. Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, Brewer MT, Thompson RC, Crystal RG. Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J Clin Invest* 1991; 87(6) : 2207–2215.
3. Abbott WA, Bridges RJ, Meister A. Extracellular metabolism of glutathione accounts for its disappearance from the basolateral circulation of the kidney. *J Biol Chem* 1984; 259: 15393-15400.
4. Ackermann-Liebrich U, Leuenberger P, Schwartz J, SAPALDIA team. Lung function and long term exposure to air pollutants in Switzerland. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 122-129.
5. Agusti A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58: 832–834.
6. Agusti AG, Morla M, Sauleda J, Saus C, Busquets X. NF-kappaB activation and iNOS upregulation. *Thorax* 2004; 59(6): 483–487.
7. Agusti AG. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 367–370.
8. Agusti AG, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Togores B, Sala E, Batle S, Busquets X. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166: 485-489
9. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Takishima T, Yaegashi H, Takahashi T. Morphometric analysis of intraluminal mucus in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 477–482.
10. Ainslie MP, McNulty CA, Huynh T, Symon FA, Wardlaw AJ. Characterisation of adhesion receptors mediating lymphocyte adhesion to bronchial endothelium provides evidence for a distinct lung homing pathway. *Thorax* 2002; 57: 1054–9.
11. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001; 2: 725–731.

12. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS: ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002; 8: 1024–1032.
13. Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Mucosal tolerance and immunity: regulating the development of allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 130: 108–118.
14. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199: 1567–1575.
15. Anastasi E, Campese AF, Bellavia D, Bulotta A, Balestr A, Pascucci M, Checquolo S, Gradini R, Lendahl U, Frat L, Gulino A, Di Mario U, Screpanti I. Expression of activated notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J Immunol* 2003; 171: 4504–4511.
16. Anto JM, Vermeire P, Vestbo J, Sunyer J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 17: 982-994.
17. Arai M, Imai H, Koumura T, Yoshida M, Emoto K, Umeda M, Chiba N, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 4924-4933.
18. Araya J, Cambier S, Markovics JA, Wolters P, Jablons D, Hill A, Finkbeiner W, Jones K, Broaddus VC, Sheppard D, Barzack A, Xiao Y, Erle DJ, Nishimura SL. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J Clin Invest* 2007; 117:3551–3562.
19. Arumugam N, Sivakumar V, Thanislass J, Pillai KS, Devaraj SN, Devaraj H. Acute pulmonary toxicity of acrolein in rats—underlying mechanism. *Toxicol Letts* 1999; 104: 189–194.
20. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911–920.
21. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167: 1245–1253.

22. Balbi B, Bason C, Balleari E, Fiasella F, Pesci A, Ghio R, Fabiano F. Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1997; 10: 846–850.
23. Baraldo S, Turato G, Badin C, Bazzan E, Beghé B, Zuin R, Calabrese F, Casoni G, Maestrelli P, Papi A, Fabbri LM, Saetta M. Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax* 2004; 59: 308–312.
24. Baraldo S, Saetta M. To reg or not to reg: that is the question in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 486-488.
25. Barcelo B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, Agusti AGN. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Resp J* 2008; 31: 585-562.
26. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
27. Barnes PJ. Genetics and pulmonary medicine. Molecular genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54: 245-25.
28. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269-280.
29. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672–688.
30. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269-280.
31. Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2005; 25: 552-563.
32. Bates DV. Chronic bronchitis and emphysema. In: Macklem PT and Permutt S, eds. *The Lung in the transition between health and disease*. New York, Marcel Dekker Inc. 1979; 12:1–13.
33. Battaglia S, Mauad T, van Schadewijk AM, Vignola AM, Rabe KF, Bellia V, Sterk PJ, Hiemstra PS. Different distribution of inflammatory cells in large and small airways in smokers. *J Clin Pathol* 2007; 60: 907-911.
34. Beg AA. Compartmentalizing NF- κ B in the gut. *Nat Immunol* 2004; 5: 14–16.
35. Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH₁ and TH₂ cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 862–868.

36. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control leishmania major persistence and immunity. *Nature* 2002; 420: 502–507.
37. Bergelson S, Pinkus R, Daniel V. Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res* 1994; 54: 36-40.
38. Berggren M, Dawson J, Moldeus P. Glutathione biosynthesis in the isolated perfused rat lung: utilization of extracellular glutathione. *FEBS Lett* 1981; 176: 189-192.
39. Beutler E, Gelbart T, Kondo T, Matsunaga AT. The molecular basis of a case of γ -glutamylcysteine synthetase deficiency. *Blood* 1999; 94: 2890-2894.
40. Birebent B, Lorho R, Lechartier H, de Guibert S, Alizadeh M, Vu N, Beauplet A, Robillard N, Semana G. Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol* 2004; 34: 3485–3496.
41. Black PN, Ching PST, Beaumont B, Ranasighe S, Taylor G, Merrilees MJ. Changes in elastic fibres in the small airways and alveoli in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 998-1004.
42. Bluestone JA, Abbas AK. Opinion-regulatory lymphocytes: natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253–257.
43. Boer WI, Hiemstra PS, Sont JK, Heer ED, Rabe KF, Krieken JHJM, Sterk PJ. Image analysis and quantification in lung tissue. *Clin Exper Allergy* 2001; 31: 504-508.
44. Bonniaud P, Kolb M, Galt T, Robertson J, Robbins C, Stampfli M, Lavery C, Margetts PJ, Robert AB, Gauldie J. Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF- β -mediated pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2004; 173: 2099–2108.
45. Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC. Characterization of the inflammatory reaction of peripheral airways of cigarette smokers using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 911-917.
46. Bosken CH, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Small airway dimensions in smokers with obstruction to airflow. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 563–570.
47. Boutin-Forzano S, Moreau D, Kalaboka S, Gay E, Bonnefoy X, Carrozzi L, Viegi G, Charpin D, Annesi-Maesano I. Reported prevalence and co-morbidity of asthma, chronic bronchitis and emphysema: a pan-European estimation. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 695–702.
48. Boutten A, Bonay M, Laribe S, Leseche G, Castier Y, Leçon-Malas V, Fournier M, Durand G, Aubier M, Dehoux M, Crestani B. Decreased expression of interleukin 13 in human lung emphysema. *Thorax* 2004; 59: 850–854.

49. Bowie AG, Moynagh PN, O'Neill LA. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF- κ B by tumour necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. Lack of involvement of H₂O₂ in NF- κ B activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 25941–25950.
50. Brissenden JE, Cox DW. Alpha2-macroglobulin in patients with obstructive lung disease, with and without α 1-antitrypsin deficiency. *Clin Chim Acta* 1983; 128: 241–248.
51. Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006; 61: 17–22.
52. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 623–630.
53. Burnett D, McGillivray DH, Stockley RA. Evidence that alveolar macrophages can synthesize and secrete alpha1-antichymotrypsin. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 473–476.
54. Cantlay AM, Smith CD, Wallace WA, Yap PL, Lamb D, Harrison DJ. Heterogenous expression and polymorphic genotype of glutathione S-transferases in human lung. *Thorax* 1994; 49: 1010-1014.
55. Caramori G, Romagnoli M, Casolari P, Bellettato C, Casoni G, Boschetto P, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM, Ciaccia A, Fabbri LM, Papi A. Nuclear localization of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax* 2003; 58: 348-351.
56. Caramori G, Di Gregorio C, Carlstedt I, Casolari P, Guzzinati I, Adcock IM, Barnes PJ, Ciaccia A, Cavallesco G, Chung KF, Papi A. Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histopathology* 2004; 45: 477–484.
57. Carolan BJ, Heguy A, Harvey BG, Leopold PL, Ferris B, Crystal RG. Up-regulation of expression of the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 gene in human airway epithelium of cigarette smokers. *Cancer Res* 2006 66: 10729–10740.
58. Casadevall C, Coronell C, Ramírez-Sarmiento AL, Martínez-Lorens J, Barreiro E, Orozco-Levi M, Gea J. Upregulation of pro-inflammatory cytokines in the intercostal muscles of COPD patients. *Eur Respir J* 2007; 30: 701–707.

59. Cassee FR, Groten JP, Feron VJ. Changes in the nasal epithelium of rats exposed by inhalation to mixtures of formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 29: 208–218.
60. Cates EC, Gajewska BU, Goncharova S, Alvarez D, Fattouh R, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Jordana M. Effect of GM-CSF on immune, inflammatory, and clinical responses to ragweed in a novel mouse model of mucosal sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 1076–1086.
61. Cates EC, Fattouh R, Wattie J, Inman MD, Goncharova S, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Jordana M. Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. *J Immunol* 2004; 173: 6384–6392.
62. Celedon JC, Lange C, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL, Reilly JJ, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Laird N, Sylvia JS, Hernandez M, Speizer FE, Weiss ST, Silverman, EK. The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet* 2004; 13(15): 1649-1656.
63. Celli BR, Halbert RJ, Isonaka S, Schau B. Population impact of different definitions of airway obstruction. *Eur Respir J* 2003; 22: 268–273.
64. Cerveri I, Accordini S, Corsico A, Zoia MC, Carrozzi L, Cazzoletti L, Beccaria M, Marinoni A, Viegi G, de Marco R; ISAYA Study Group. Chronic cough and phlegm in young adults. *Eur Respir J* 2003; 22: 413–417.
65. Chapman KR, Mannino DM, Soriano, JB, Vermeire PA, Buist S, Thun MJ, Connell C, Jemal A, Lee TA, Miravittles M, Aldington S, Beasley R. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27: 188-207.
66. Chari R, Lonergan KM, Ng RT, MacAulay C, Lam WL, Lam S. Effect of active smoking on the human bronchial epithelium transcriptome. *BMC Genomics* 2007; 8: 297.
67. Chen KH, Reece LM, Leary JF. Mitochondrial glutathione modulates TNF- α -induced endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 100-109.
68. Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS. The role of Nuclear factor-kB in pulmonary diseases. *Chest* 2000; 117: 1482-1487.
69. Cho S, Hazama M, Urata Y. Protective role of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Free Radic Cell Biol Med* 1999; 26: 589-602.

70. Choi AM, Elbon CL, Bruce SA, Bassett DJ. Messenger RNA levels of lung extracellular matrix proteins during ozone exposure. *Lung* 1994; 172: 15-30.
71. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 1(34): 50s-59s.
72. Chung KF, Adcock IA. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 2008; 31: 1334-1356.
73. Cosio MG, Hale KA, Niewoehner DE. Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 265–321.
74. Cosio MG. Autoimmunity, T-cells and STAT-4 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; 24 :3-5.
75. Cottrez F, Groux H. Regulation of TGF- β response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol* 2001;167: 773–778.
76. Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The role of ICOS and other costimulatory molecules in allergy and asthma. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 25: 349–359.
77. Dal Negro R, Rossi A, Cerveri I. The burden of COPD in Italy: results from the Confronting COPD survey. *Respir Med* 2003; 97: S43–S50.
78. Dao Nguyen X, Robinson DS. Fluticasone propionate increases CD4CD25 T regulatory cell suppression of allergen-stimulated CD4CD25 T cells by an IL-10- dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 296–301.
79. de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol* 2000; 190: 619–626.
80. de Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J, Rogers RM. Elevated TNF- α production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 633–637.
81. De Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 289–307.
82. de Marco R, Accordini S, Cerveri I, Corsico A, Sunyer J, Neukirch F, Künzli N, Leynaert B, Janson C, Gislason T, Vermeire P, Svanes C, Anto JM, Burney P. An international survey of chronic obstructive pulmonary disease in young adults according to GOLD stages. *Thorax* 2004; 59: 120–125.

83. de Marco R, Accordini S, Cerveri I, Corsico A, Antó JM, Künzli N, Janson C, Sunyer J, Jarvis D, Chinn S, Vermeire P, Svanes C, Ackermann-Liebrich U, Gislason T, Heinrich J, Leynaert B, Neukirch F, Schouten JP, Wjst M, Burney P. Incidence of chronic obstructive pulmonary disease in a cohort of young adults according to the presence of chronic cough and phlegm. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 32–39.
84. Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 998–1005.
85. Devalia JL, Davies RJ. Airway epithelial cells and mediators of inflammation. *Respir Med* 1993; 87: 405-408.
86. D'hulst AI, Maes T, Bracke KR, Demedts IK, Tournoy KG, Joos GF, Brusselle GG. Cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in *scid*-mice. Is the acquired immune system required? *Respir Res* 2005; 6: 147.
87. Dijaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M. Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunol* 2006; 117: 289.
88. Di Stefano A, Turato G, Mastrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri P, Boschetto LM, Fabbri LM, Saetta M. Airway limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocytes and macrophages infiltration in bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153: 629-632.
89. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Caramori G, Balbo P, Ioli F, Sacco S, Gnemmi I, Brun P, Adcock IM, Balbi B, Barnes PJ, Chung KF, Donner CF. Decreased T lymphocyte infiltration in bronchial biopsies of subjects with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 893–902.
90. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, Adcock IM. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002; 20: 556-563.
91. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193: 233–238.

92. Dong X, Craig T, Xing N, Bachman LA, Paya CV, Weih F, McKean DJ, Kumar R, Griffin MD. Direct transcriptional regulation of RelB by 1α -25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs: physiologic and therapeutic implications for dendritic cell function. *J Biol Chem* 2003; 278: 49378–49385.
93. Duan D, Bukpitt AR, Pinkerton KE, Ji C, Plopper GC. Ozone-induced alterations in glutathione in lung subcompartments of rats and monkeys. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14 : 70-75.
94. Dummount A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Droge W, Schmittz ML. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95 independent, requires the release of mitochondrial reactive oxygen species and the activation of NF-kappa B. *Oncogene* 1999; 18: 747-757.
95. Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. 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.
96. Drost EM, Selby C, Lannan S, Lowe GD, MacNee W. Changes in neutrophil deformability following in vitro smoke exposure: mechanism and protection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 287-295.
97. Esteve JM, Mompo J, de la Asuncion JG, Sastre J, Asensi M, Boix J, Vina JR, Vina J, and Pallardó FV. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 1999; 13: 1055-1064.
98. Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, Rabe PB. Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 204-212.
99. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004; 172: 5149–5153.
100. Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, Pilewski JM, Stoner MW, Csizmadia E, Zhang Y, Sciruba FC, Duncan SR. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 156–163.
101. Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Marí M, Miranda M, Ardite E. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 1998; 8: 7-11.

102. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152 : 1666-72.
103. Foussat A, Cottrez F, Brun V, Fournier N, Breittmayer JP, Groux H. A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J Immunol* 2003; 171: 5018–5026.
104. Fraig M, Shreesha U, Savici D, Katzenstein AL. Respiratory bronchiolitis: a clinicopathologic study in current smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 647–653.
105. Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA Jr. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol* 2002; 29: 3–14.
106. Fehervari Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 203–208.
107. Foda HD, Rollo EE, Brown P, Pakbaz H, Berishe H, Said SI, Zucker S. Attenuation of oxidant-induced lung injury by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor BB-3103. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 650-653.
108. Folz RJ, Peno-Green L, Crapo JD. Identification of a homozygous mis-sense mutation (Arg to Gly) in the critical binding region of the human EC-SOD gene (SOD3) and its association with dramatically increased serum enzyme levels. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2251–2254.
109. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330–336.
110. Freeman CM, Curtis JL, Chensue SW. CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD8+ cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity. *Am J Pathol* 2007; 171:767–776.
111. Funada Y, Nishimura Y, Yokoyama M. Imbalance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 is associated with pulmonary emphysema in Klotho mice. *Kobe J Med Sci* 2004; 50: 59–67.
112. Gad M, Pedersen AE, Kristensen NN, Claesson MH. Demonstration of strong enterobacterial reactivity of CD4+CD25- T cells from conventional and germ-free mice which are counter-regulated by CD4+CD25+ T cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 695–704.

113. Galter D, Mihm S, Droge W. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factors κ B and the activator protein-1. *Eur J Biochem* 1994; 221: 639-648.
114. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 574–580.
115. Gilks CB, Price K, Wright JL, Churg A. Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. *Am J Pathol* 1998; 152: 269-278.
116. Gilmore AB, McKee M. Tobacco and transition: an overview of industry investments impact and influence in the former Soviet Union. *Tob Control* 2004; 13: 136-142.
117. Gold DR, Wang X, Wypij D, Spizer FE, Ware JH, Dockery DW. Effects of cigarette smoking on the pulmonary function in adolescent boys and girls. *N Engl J Med* 1996; 335:931-937.
118. Gorecka D, Bednarek M, Nowinski A, Puscinska E, Goljan-Geremek A, Zielinski J. Diagnosis of airflow limitation combined with smoking cessation advice increases stop-smoking rate. *Chest* 2003; 123: 1916–1923.
119. Gosman MME, Willemse BWM, Jansen DF, Lapperre TS, van Schadewijk A, Hiemstra PS, Postma DS, Timens W, Kerstjens HAM and GLUCOLD Study Group. Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2006; 27: 60-64.
120. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167: 1945–1953.
121. Griffith OW, Bridges RJ, Meister A. Transport of glutamyl amino acids: role of glutathione and c-glutamyltranspeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 6319-6322.
122. Griffith OW, Meister A. Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound c-glutamyl transpeptidase as a discrete step in the c-glutamyl cycle: glutathionuria after inhibition of transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 268-272.
123. Groneberg DA, Niimi A, Dihn QT, Cosio B, Hew M, Fischer A, Chung KF. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170(12): 1276-1280.

124. Griffith OW, Meister A. Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound c-glutamyl transpeptidase as a discrete step in the c-glutamyl cycle: glutathionuria after inhibition of transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 268-272.
125. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003; 24: 242–248.
126. Hagen K, Zhu C, Melefors O, Hultcrantz R. Susceptibility of cultured rat hepatocytes to oxidative stress by peroxides and iron. The extracellular matrix affects the toxicity of tert-butyl hydroperoxide. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 499-508.
127. Halbert RJ, Isonaka S, George D, Iqbal A. Interpreting COPD prevalence estimates: what is the true burden of disease? *Chest* 2003; 123: 1684–1692.
128. Hall AG. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 238-235.
129. Hansen G, Yeung VP, Berry G, Umetsu DT, DeKruyff RH. Vaccination with heat-killed listeria as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8+ T cells and IL-18. *J Immunol* 2000; 164: 223–230.
130. Harvey BG, Heguy A, Leopold PL, Carolan BJ, Ferris B, Crystal RG. Modification of gene expression of the small airway epithelium in response to cigarette smoking. *J Mol Med* 2007; 85: 39–53.
131. He JQ, Shumansky K, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD, Sandford AJ. Association of genetic variations in the *CSF2* and *CSF3* genes with lung function in smoking-induced COPD. *Eur Respir J* 2008; 32: 25-34.
132. Heguy A, O'Connor TP, Luetlich K, Worgall S, Ciecuch A, Harvey BG, Hackett NR, Crystal RG. Gene expression profiling of human alveolar macrophages of phenotypically normal smokers and nonsmokers reveals a previously unrecognized subset of genes modulated by cigarette smoking. *J Mol Med* 2006; 84: 318–328.
133. Heffner JA, Repine JE. State of art: pulmonary strategies of antioxidant defence. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 531-554.
134. Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3633-3638.

135. Hodge S, Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN. Increased airway granzyme b and perforin in current and ex-smoking COPD subjects. *COPD* 2006; 3:179–187.
136. Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003; 81: 289–296.
137. Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37: 748–755.
138. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645–2653.
139. Holt PG, Macaubas C, Prescott SL, Sly PD. Primary sensitization to inhalant allergens. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: S91–S94.
140. Holt PG, Rowe J, Loh R, Sly PD. Developmental factors associated with risk for atopic disease: implications for vaccine strategies in early childhood. *Vaccine* 2003; 21: 3432–3435.
141. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061.
142. Horne SL, Cockcroft DW, Lovegrove A, Dosman JA. ABO, Lewis and secretor status and relative incidence of airflow obstruction. *Dis Markers* 1985; 3: 55–62.
143. Hoppers J, Postma DS, Rijcken B, Weiss ST, Schouten JP. Histamine airways hyperresponsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study. *Lancet* 2001; 356: 1313-1317.
144. Innes AL, Woodruff PG, Ferrando RE, Donnelly S, Dolganov GM, Lazarus SC, Fahy JV. Epithelial mucin stores are increased in the large airways of smokers with airflow obstruction. *Chest* 2006; 130: 1102–1108.
145. Isajevs S, Taivans I, Kopeika U, Strazda G. Central and peripheral airways expression of NF- κ Bp65 and HDAC2 in COPD. *Virchows Arch* 2005; 387.
146. Isajevs S, Taivans I, Kopeika U, Strazda G. Influence of cigarette smoking history on HDAC2 expression in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006; 28: 190s.
147. Isajevs S, Taivans I, Kopeika U, Strazda G. Inflammatory cells and HDAC2 expression in peripheral airways of COPD patients. *Mod Pathol* 2006; 19: 167-168.

148. Isajevs S, Markovs J, Knipshe G. Possible role of T-regulatory cells in the chronicity of tonsillitis. *Mod Pathol* 2006; 19: 107-108.
149. Isajevs S, Markovs J, Zilevica A, Viesturs U, G. Knipshe. Diagnostic value of histological and microbiological screening in recurrent tonsillitis. *Bioautomation* 2006; 5: 49-56.
150. Isajevs S, Pupure J, Gordjushina V, Kratovska A, Taivans I, Vīksna L, Kalviņš I, Kluša V. Mildronate protects cardiopathy caused by stavudine and lamivudine. *Proc. Latvian Acad Sci Section B* 2007; 2007; 61 (1/2): 26-32.
151. Isajevs S, Taivans I, Kopeika U, Strazda G. Iekaisīgās pārmaiņas centrālajos un perifērajos elpceļos asimptomātiskiem smēķētājiem un HOPS pacientiem. *Latvijas Universitātes Zinātniskie Raksti, Medicīna*, 2007;712: 64-75.
152. Isajevs S, Markovs J, Knipshe G, Žileviča A. Onkoproteīna BCL-2, citokeratīna 19 un S-100 ekspresija mandeļu šūnās hroniska tonsilīta pacientiem. *Latvijas Universitātes Zinātniskie Raksti, Medicīna*, 2007; 712 (6): 40-46.
153. Isajevs S, Taivans I, Strazda G, Kopeika U, Bukovskis M, Gordjusina V, Kratovska A. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. *Eur Respir J* 2009; 33 (1): 61-67.
154. Ishii T, Matsuse T, Teramoto S. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54: 693-696.
155. Ito K, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001; 15: 1110-1112.
156. Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, Adcock IM. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-κB suppression. *J Exp Med* 2006; 203: 7-13.
157. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1967-1976.
158. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001; 15: 1110-1112.

159. Iwanga M, Mori K, Iida T. Nuclear factor-kB dependent induction of γ -glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation in T98G human glioblastoma cells. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1256-1268.
160. Jurka N, Taivans I., Šķesteris A, Bukovskis M., Strazda G. Šūnu spektrs, antioksidantu līmenis un oksidatīvais statuss inducētajās krēpās nesmēķējošiem un smēķējošiem bronhiālās astmas slimniekiem. *Latvijas Universitātes Zinātniskie Raksti, Medicīna* 2001; 4 (2): 43-63.
161. Kaiser S. Mortality (SDR) from COPD for men in the EU-27 in 2003. In: EUPHIX, EUphact. Bilthoven: RIVM, EUphact\ Health Status\ Diseases, disorders, injuries\ Other non-communicable diseases\ COPD, 5 November 2007.
162. Kalliomaki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3: 15–20.
163. Kalsheker NA, Hodgson IJ, Watkins GL, White JP, Morrison HM, Stockley RA. Deoxyribonucleic acid (DNA) polymorphism of the α 1-antitrypsin gene in chronic lung disease. *Br Med J* 1987; 294: 1511–1514.
164. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogendriven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 984–993.
165. Kapsenberg ML, Jansen HM, Bos JD, Wierenga EA. Role of type 1 and type 2 T helper cells in allergic diseases. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 788–793.
166. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Rückert B, Mantel PY, Menz G, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1425–1433.
167. Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P. Allergen responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 2004; 199: 1679–1688.
168. Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 737–744.
169. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(2): 530-534.
170. Kehrer JP, Biswal SS. The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci* 2000; 57 : 6–15.

171. Kelsen SG, Duan X, Ji R, Perez O, Liu C, Merali S. Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38(5): 541-50.
172. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 337–342.
173. Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W. Transforming growth factor (TGF)- β 1-producing regulatory T cells induce smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- β 1-mediated fibrosis. *J Exp Med* 2003; 196: 13–23.
174. Kim WD, Eidelman DH, Izquierdo JL, Ghezzi H, Saetta MP, Cosio MG. Centrilobular and panlobular emphysema in smokers. Two distinct morphologic and functional entities. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1385–1390.
175. Kim KM, Park SH, Kim JS, Lee WK, Cha SI, Kim CH, Kang YM, Jung TH, Kim IS, Park YI. Polymorphisms in the Type IV Collagen Alpha3 Gene and the Risk of COPD. *Eur Respir J* 2008; 32: 35-41.
176. Koch A, Giembycz M, Ito K. Mitogen-Activated Protein Kinase Modulation of Nuclear Factor- κ B-Induced Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor Release from Human Alveolar Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 342-349.
177. Koyama H, Geddes DM. Genes, oxidative stress and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1998; 53: S10-S14.
178. Klusa V, Pupure J, Isajevs S, Rumaks J, Gordjushina V, Kratovska A, Taivans I, Svirskis S, Viksna L, Kalvinsh I. Protection of azidothymidine-induced cardiopathology in mice by mildronate, a mitochondria-targeted drug. *Basic Pharmacol Toxicol* 2006; 99(4): 323-328.
179. Koethe SM, Kuhnmuensch JR, Becker CG. Neutrophil priming by cigarette smoke condensate and a tobacco anti-idiotypic antibody. *Am J Pathol* 2000; 157: 1735–1743.
180. Kranenburg AR, Willems-Widyastuti A, Mooi WJ, Saxena PR, Sterk PJ, de Boer WI, Sharma HS. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with enhanced bronchial expression of FGF-1, FGF-2, and FGFR-1. *J Pathol* 2005; 206: 28–38.

181. Krzyzanowski M, Jedrychowski W, Wysocki M. Factors associated with the change in ventilatory function and the development of chronic obstructive pulmonary disease in a 13 year follow-up of the Cracow study. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 1011–1019.
182. Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ. c-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 586-592.
183. Kurie JM, Shin HJ, Lee JS, Morice RC, Ro JY, Lippman SM, Hittelman WN, Yu R, Lee JJ, Hong WK. Increased epidermal growth factor receptor expression in metaplastic bronchial epithelium. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1787–1793.
184. Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J* 1996; 9: 1989–1994.
185. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 537-548.
186. Lagrue G, Branellec A, Lebarry F. Toxicology of tobacco. *Rev Prat* 1993; 43: 1203–1207.
187. Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 994–1003.
188. Lams BEA., Sousa AR, Rees PJ, Lee TH. Subepithelial immunopathology of large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000; 15: 512-516.
189. Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA, Roebuck KA. Hydrogen peroxide and tumour necrosis factor- α induce differential binding of the redox-responsive transcription factor AP-1 and NF- κ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 1996; 273: 32670-32678.
190. Lannan S, Donaldson K, Brown D, MacNee W. Effects of cigarette smoke and its condensates on alveolar cell injury in vitro. *Am J Physiol* 1994; 266: L92-L100.
191. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 450–463.

192. Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM. Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 1992; 13: 227-232.
193. Lavigne MC, Thakker P, Gunn J, Wong A, Miyashiro JS, Wasserman AM, Wei SQ, Pelker JW, Kobayashi M, Eppihimer MJ. Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 12: 534-546.
194. Lee KY, Ito K, Hayashi R, Jazraw EPII, Barnes PJ, Adcock IM. NF- κ B and Activator Protein 1 Response Elements and the Role of Histone Modifications in IL-1 β -Induced TGF- β 1 Gene Transcription. *J Immunol* 2006, 176: 603-615
195. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson HO, Cogswell S, Storness-Bliss C, Corry DB, Kheradmand F. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007; 13: 567–569.
196. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyzna F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A. Expression of the integrin α Eb7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13031–13036.
197. Li XY, Donaldson K, Rahman I, MacNee W. An investigation of the role of glutathione in the increased permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro. *Am Rev Respir Care Med* 1994; 149: 1518-1525.
198. Liu RM, Gao L, Choi J, Forman HJ. γ -glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol* 1998; 275: L861-L869.
199. Liu H, Lightfoot R, Stevens JL. Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols. *J Biol Chem* 1996; 271: 4805-4812.
200. Li XY, Rahman I, Donaldson K, MacNee W. Mechanisms of cigarette smoke induced increased airspace permeability. *Thorax* 1996; 51: 465-471.
201. Liu B, Andrieu-Abadie N, Levade T, Zhang P, Obeid LM, Hannum YA. Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumour necrosis factor- α -induced cell death. *J Biol Chem* 1998; 273: 11313-11320.

202. Li H, Marchall ZM, Whorton AR. Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels. *Am J Physiol* 1999; 76: C803-C811
203. Liu W, Akhand AA, Kato M, Yokoyama I, Miyata T, Kurokawa K, Uchida K, Nakashima I. 4-Hydroxynonenal triggers an epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition. *J Cell Sci* 1999; 112: 2409–2417.
204. Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N, Nakashima I. 4-Hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* 2000; 113: 635–641.
205. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1355–1360.
206. Lindberg A, Jonsson AC, Ronmark E, Lundgren R, Larsson LG, Lundback B. Ten-year cumulative incidence of COPD and risk factors for incident disease in asymptomatic cohort. *Chest* 2005; 127: 1544–1552.
207. Lindmark B, Svenonius E, Eriksson S. Heterozygous α 1-antichymotrypsin and PiZ α 1-antitrypsin deficiency: prevalence and clinical spectrum in asthmatic children. *Allergy* 1990; 45: 197–20
208. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergendriven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363: 608–615.
209. Loddenkemper R, Gibson GJ, Sibille Y, eds. European Respiratory Society/European Lung Foundation. European Lung White Book. The First Comprehensive Survey on Respiratory Health in Europe. Sheffield, ERS, 2003; 34–43.
210. Logue EC, Sha WC. CD28-B7 bidirectional signaling: a two-way street to activation. *Nat Immunol* 2004; 5: 1103–1105.
211. Lokke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: 25 year follow up study of the general population. *Thorax* 2006; 61: 935–939.
212. Lois M, Brown LA, Moss IM, Roman J, Guidot DM. Ethanol ingestion increases activation of matrix metalloproteinases in rat lungs during acute endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1354-1360.

213. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445–449.
214. Macnee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutics targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 58-65.
215. Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD. CD8+ T cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Immunol* 2007; 178: 8090–8096.
216. Maes T, Bracke KR, Vermaelen KY, Demedts IK, Joos GF, Pauwels RA, Brusselle GG. Murine TLR4 is implicated in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141: 354–368.
217. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17: 946–953.
218. Makris D, Tzanakis N, Damianaki A, Ntaoukakis E, Neofytou E, Zervou M, Sifakas NM, Tzortzaki EG. Microsatellite DNA instability and COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2008; 32: 612-618.
219. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2: 816–822.
220. Mannino DM, Brown G, Giovino GA. Obstructive lung disease deaths in the United States from 1979 through 1993. An analysis using multiple cause mortality data. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 814-818.
221. Mannino DM, Watt G, Hole D, Gillis C, Hart C, McConnachie A, Davey Smith G, Upton M, Hawthorne V, Sin DD, Man SF, Van Eeden S, Mapel DW, Vestbo J. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27: 627–643.
222. Markovs J, Isajevs S, Knipshe G. Immunological tolerance and recurrent tonsillitis. *Eesti Arst* 2005; 6: 74-76.
223. Marwick JA, Kirkham PA, Stevenson CS, Danahay H, Giddings J, Butler K, Donaldson K, Macnee W, Rahman I. Cigarette smoke alters chromatin remodeling and induces proinflammatory genes in rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31(6): 633-642
224. Masubuchi T, Koyama S, Sato E, Takamizawa A, Kubo K, Sekiguchi M, Nagai S, Izumi T. Smoke extract stimulates lung epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am J Pathol* 1998; 153: 1903–1912.

225. Matsumoto K, Inoue H, Fukuyama S, Tsuda M, Ikegami T, Kibe A, Yoshiura Y, Komori M, Hamasaki N, Aizawa H, Nakanishi Y. Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 295–302.
226. Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*, 2002; 296:301-305.
227. Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1271: 35-42.
228. Menezes AMB, Victora CG, Rigatto M. Prevalence and risk factors for chronic bronchitis in Pelotas, Brazil: a population based study. *Thorax* 1994; 49: 1217-1221.
229. Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Montes de Oca M, Talamo C, Hallal PC, Victora CG; PLATINO Team. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 2005; 366: 1875–1881.
230. Meyer M, Schreck R, Bauerle PA. Hydrogen peroxide and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 1993; 12: 2005-2015.
231. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol*. 2004; 11: 841-855.
232. Miller LA, Hurst SD, Coffman RL, Tyler, NK, Stovall MY, Chou, DL. Airway generation-specific differences in the spatial distribution of immune cells and cytokines in allergen-challenged rhesus monkeys. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 894–906.
233. Mishra A, Chaudhary A, Sethi S. Oxidized omega-3 fatty acids inhibit NF-kappaB activation via a PPARalpha-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 9: 1621-1627.
234. Moellering D, McAndrew J, Patel RP. The induction of GSH synthesis by nanomolar concentration of NO in endothelial cells: a role of γ -glutamylcysteine synthetase and γ -glutamyltranspeptidase. *FEBS Lett* 1999; 448: 292-296.
235. Moodie FM, Marwick JA, Anderson CS, Szulakowski P, Biswas SK, Bouter MR, Kilty I, Rahman I. Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but

- differentially regulate NF- κ B activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J* 2004; 18: 1897–1899.
236. Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation and oxidant status in the airspaces of chronic smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1-8.
237. Morales A, Garcia-Ruiz C, Miralda M. Tumour necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain by γ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 1997; 272: 30371-30379.
238. Morales A, Miranda M, Sanchez-Reyes A, Colell A, Biete A, Fernandez-Checa JC. Transcriptional regulation of the heavy subunit chain of γ -glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation. *FEBS Lett* 1998; 427 : 15-20.
239. Morrison D, Strieter RM, Donnelly SC, Burdick MD, Kunkel SL, MacNee W. Neutrophil chemokines in bronchoalveolar lavage fluid and leukocyte-conditioned medium from nonsmokers and smokers. *Eur Respir J* 1998; 12: 1067–1072.
240. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 145–173.
241. Mulier B, Rahman I, Watchorn T, Donaldson K, MacNee W, Jeffery PK. Hydrogen peroxide-induced epithelial injury: the protective role of intracellular non protein thiols (NPSH). *Eur Respir J* 1998 ; 11 : 384-391.
242. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7- 2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172: 4100–4110.
243. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harpers' biochemistry* 1998.
244. Murtagh E, Heaney L, Gingles J, Shepherd R, Kee F, Patterson C, MacMahon J. Prevalence of obstructive lung disease in a general population sample: the NICECOPD study. *Eur J Epidemiol* 2005; 20: 443–453.
245. Nishikawa M, Nobumasa K, Ito T, Kudo M, Kaneko T, Suzuki M, Udaka N, Ikeda H, Okubo T. Superoxide mediates cigarette smoke-induced infiltration of neutrophils into the airways through nuclear factor - κ B activation and Il-8 mRNA expression in guinea pigs in vivo. *Am. J. Respir. Cell. Mol Biol* 1999; 20: 189-198.

246. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, Pierrou S, Lund J, Holgate ST, Davies DE, Delany DJ, Wilson SJ, Djukanovic R. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax* 2004; 59: 837–842.
247. O'Donnell RA, Richter A, Ward J, Angco G, Mehta A, Rousseau K, Swallow DM, Holgate ST, Djukanovic R, Davies DE, Wilson SJ. Expression of ErbB receptors and mucins in the airways of long term current smokers. *Thorax* 2004; 59: 1032–1040.
248. Oosterhout AJM, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *Eur Respir J* 2005; 26 : 918-932.
249. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T-lymphocytes with FEV₁. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155, 852-857.
250. Ostroukhova M, Seguin-Devaux C, Oriss TB, et al. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4+ T cells expressing membrane-bound TGF- β and FOXP3. *J Clin Invest* 2004; 114: 28–38.
251. Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, Carrell RW. Mutation of antitrypsin to antithrombin: α 1-antitrypsin Pittsburgh (358 met \rightarrow arg), a fatal bleeding disorder. *N Engl J Med* 1983; 309: 694–698.
252. Pabst R, Tschernig T. Perivascular capillaries in the lung: an important but neglected vascular bed in immune reactions? *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 209–14.
253. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Chung HT. Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 701–705.
254. Palange P, Testa U, Huertas A, Calabrò L, Antonucci R, Petrucci E, Pelosi E, Pasquini L, Satta A, Morici G, Vignola MA, Bonsignore MR. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J* 2006; 27: 529–541.
255. Paleotti P, Carrozzi L, Viegi G. Distribution of bronchial responsiveness in a general population: effect of sex, age, smoking and level of pulmonary function. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1770-1777.
256. Pasare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity* 2004; 21: 733–741.

257. Pauwels RA, Buist AS, Calverey MA, Jenkins CR, Hurd SS. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163, 1256-1276.
258. Peno-Green L, Crapo JD, Folz RJ. Characterization of human serum extracellular superoxide dismutase variants in normal and lung disease individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: A167.
259. Pelkonen M, Notkola IL, Nissinen A, Tukiainen H, Koskela H. Thirty-year cumulative incidence of chronic bronchitis and COPD in relation to 30-year pulmonary function and 40-year mortality: a follow-up in middleaged rural men. *Chest* 2006; 130: 1129–1137.
260. Peters JM, Avol E, Gauderman J. A study of twelve southern California communities with different levels and types of air pollution. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 768-775.
261. Pesci A, Majori M, Cuomo A. Neutrophils infiltration bronchial epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 1998; 92: 863-870.
262. Pesci A, Balbi B, Majori M, Cacciani G, Bertacco S, Alciato P, Donner CF. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1998; 12: 380–386.
263. Pesci A, Rossi GA, Bertorelli G, Aufiero A, Zanon P, Olivieri D. Mast cells in the airway lumen and bronchial mucosa of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1311–1316.
264. Phelps, DT, Ferro TJ, Higgins PJ, Shankar R, Parker DM, Johnson A. TNF- α induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase. *Am J Physiol* 1995; 29 : L551-L559.
265. Pietarinen-Runti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hypoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 286-292.
266. Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, Dolovich J, Hargreave FE. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1511–1517.

267. Pilette C, Colinet B, Kiss R, André S, Kaltner H, Gabius HJ, Delos M, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y. Increased galectin-3 expression and intra-epithelial neutrophils in small airways in severe COPD. *Eur Respir J* 2007; 29: 914–922.
268. Poller W, Barth J, Voss B. Detection of an alteration of the α 2-macroglobulin gene in a patient with chronic lung disease and serum α 2-macroglobulin deficiency. *Hum Genet* 1989; 83: 93–96.
269. Poller W, Meison C, Olek K. DNA polymorphisms of the α 1-antitrypsin gene region in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Clin Invest* 1990; 20: 1–7.
270. Poller W, Faber JP, Scholz S, Weidinger S, Bartholomé K, Olek K, Eriksson S. Missense mutation of α 1-antichymotrypsin gene associated with chronic lung disease. *Lancet* 1992; 339: 1538.
271. Pons J, Sauleda J, Ferrer JM, Barecelo B, Regueiro V, Julia MR., Agusti AGN. Blunted $\phi\delta$ T-lymphocytes response in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005; 25: 441-446.
272. Pons AR, Noguera A, Blanquer D, Sauleda J, Pons J, Agusti AGN. Phenotypic characterisation of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD. *Eur Respir J* 2005; 25: 647–652.
273. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Chronic mucus hypersecretion in COPD and death from pulmonary infection. *Eur Respir J* 1995; 8: 1333–1338.
274. Prescott E, Bjerg AM, Andersen PK, Lange P, Vestbo J. Gender difference in smoking effects on lung function and risk for hospitalization for COPD. Results from a Danish longitudinal population study. *Eur Respir J* 1997; 10: 822-827.
275. Prescott, E. Socioeconomic status and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54: 737-741.
276. Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353: 196–200.
277. Prieto A, Reyes E, Bernstein ED, Martinez B, Monserrat J, Izquierdo JL, Callol L, de LUCAS P, Alvarez-Sala R, Alvarez-Sala JL, Villarrubia VG, Alvarez-Mon M. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (immunoferon). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1578–1583.

278. Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 2001; 293: 253–256.
279. Pudule I, Grinberga D, Kadziauskiene K, Abaravicius A, Vaask S, Robertson A, McKee Patterns of smoking in the Baltic Republics. *J Epidemiol Commun Health* 1999; 53: 277-283.
280. Pupure J, Isajevs S, Gordjushina V, Taivans I, Rumaks J, Svirskis S, Kratovska A, Zane Dzirkale, Jelena Pilipenko, Gunars Duburs, Klusa V. Distinct Influence of Atypical 1,4-Dihydropyridine Compounds in Azidothymidine-Induced Neuro- and Cardiotoxicity in Mice *Ex Vivo*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008; 103: 401-406.
281. Rahman I, Li XY, Donaldson K, Harrison DJ, MacNee W. Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *Am J Physiol* 1995; 269: L285-292.
282. Rahman I, Lawson MF, Smith CD, Harrison DJ, MacNee W. Induction of γ -glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 1996; 396: 21-25.
283. Rahman I, Bel A, Mulier B, Donaldson K, MacNee W. Differential effects of oxidants and dexamethasone on cglutamylcysteine synthetase and c-glutamyl trans-peptidase in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: L80-L86.
284. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*, 1998; 53: 601-612.
285. Rahman I, Bel A, Mulier B, Donaldson K, MacNee W. Differential effects of oxidans and dexamethasone on γ -glutamylcysteine synthetase and γ -glutamyl trans-peptidase in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; 275: L80-L86.
286. Rahman I, Antoniecelli F, MacNee W. Molecular mechanism of the regulation of glutathione synthesis by tumour necrosis factor α and dexamethasone in human alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 5088-5096.
287. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 2000; 16: 534-554.
288. Rahman I, van Schadewijk AA, Hiemstra PS, Stolk J, van Krieken JH, MacNee W, de Boer WI. Localisation of c-glutamylcysteine synthetase messenger RNA expression in lungs

- of smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 920-925.
289. Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra, PS, Stolk J, MacNee W, De Boer WI. 4-Hydroxy-2-Nonenal, a Specific Lipid Peroxidation Product, Is Elevated in Lungs of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 490-495.
290. Rahman I, Adcock. IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006; 28 : 219-242.
291. Rajendrasozhan S, Deacetylates and NF-kB in redox regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2008; 10 (4): 799-811.
292. Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, Rahman I. SIRT1, an anti-inflammatory and anti-aging protein, is decreased in lungs of patients with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 861-70.
293. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tuder RM, Biswal S. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 2004; 114:1248–1259.
294. Reid LM. Pathology of chronic bronchitis. *Lancet* 1954; 266: 274–278.
295. Renda T, Baraldo S, Pelaia, Bazzan E, Turato G, Papi A, Maestrelli P, Maselli R, Vatrella A, Fabbri LM, Zuin R, Marsico SA, Saetta M. Increased activation of p38 MAPK in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31:62-69.
296. Reilly CA, Taylor JL, Lanso DL, Carr BA, Crouch DJ, Jost GS. Capsacinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicol Sci* 2003; 73(1): 170-181.
297. Rijcken B, Britton J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* 1998; 7: 41-73.
298. Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98: 279–285.
299. Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 399–408.

300. Rouzer CA, Scott WA, Griffith OW, Hammill AL, Cohn ZA. Glutathione metabolism in resting and phagocytizing peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 1982; 257: 2002-2008.
301. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006; 86: 245–278.
302. Rutgers SR, Timens W, Kaufmann HF, Mark TW, Koeter GH, Postma DS. Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2000; 15: 109-115.
303. Sietta M, Di Stefano A, Mastrelli P. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993, 147, 301-306.
304. Sietta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A, Calcagni P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 803–810.
305. Sietta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallesco G, Tropeno C, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ve Cells in the Lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 711- 717.
306. Sietta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 822-826.
307. Sietta M, Turato G, Baraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, Maestrelli P, Cavallesco G, Papi A, Fabbri LM. Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1016–1021.
308. Sietta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 163: 1304-1309.
309. Sietta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, Turato G, Buonsanti C, Baraldo S, Bellettato CM, Papi A, Corbetta L, Zuin R, Sinigaglia F, Fabbri LM. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1404–1409.

310. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/Elafin) in human airway epithelial airway cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 733–741.
311. Sandford AJ, Weir TD, Paré PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1997; 10: 1380–1391.
312. Sandström J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. Tenfold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparinbinding domain. *J Biol Chem* 1994; 268: 19163–19166.
313. Sato T, Seyama K, Sato Y, Mori H, Souma S, Akiyoshi T, Kodama Y, Mori T, Goto S, Takahashi K, Fukuchi Y, Maruyama N, Ishigami A. Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174 : 530–537.
314. Schirnhofner L, Lamprecht B, Vollmer WM, Allison MJ, Studnicka M, Jensen RL, Buist AS. COPD prevalence in Salzburg, Austria: results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study. *Chest* 2007; 131: 29–36.
315. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117: 684–694.
316. Sekhar KR, Meredith MJ, Kerr LD. Expression of glutathione and γ -glutamylcysteine synthetase mRNA is Jun dependent. *Biochem. Biophys Res Commun* 1997; 234: 588-593.
317. Shahar E, Folsom AR, Melnick SL. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and smoking-related chronic obstructive pulmonary disease. Atherosclerosis risk in Communities Study Investigators. *N Engl J Med* 1994; 331, 228-233.
318. Shevach EM. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:389–400.
319. Shim JJ, Dabbagh K, Ueki IF, Dao-Pick T, Burgel PR, Takeyama K, Tam DC, Nadel JA. IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L134–L140.
320. Sierra-Rivera E, Dasouki M, Summar ML, Krishnamani MR, Meredith M, Rao PN, Phillips JA, Freeman ML. Assignment of the human gene (GLCLR) that encodes the

- regulatory subunit of c-glutamylcysteine synthetase to chromosome 1p21. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 72: 252-254.
321. Silverman E. Gender-related differences in severe, early onset COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2152-2158.
322. Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, Singh D. CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest* 2007; 132: 156–163.
323. Snoeck-Stroband JB, Lapperre TS, Gosman MM, Boezen HM, Timens W, ten Hacken NH, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstra PS; Groningen Leiden Universities Corticosteroids in Obstructive Lung Disease (GLUCOLD) Study Group. Chronic bronchitis sub-phenotype within COPD: inflammation in sputum and biopsies. *Eur Respir J* 2008; 31: 70–77.
324. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 1990; 85: 682–689.
325. Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Müller C, Kubach J, Becker C, Knop J, Enk AH, Schmitt S, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD25⁺ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins $\alpha 4\beta 7$ or $\alpha 4\beta 1$ confer distinct suppressive properties upon CD4⁺ T helper cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1303–1311.
326. Stratelis G, Jakobsson P, Molstad S, Zetterstrom O. Early detection of COPD in primary care: screening by invitation of smokers aged 40 to 55 years. *Br J Gen Pract* 2004; 54: 201–206.
327. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685–711.
328. Stringer KA, Tobias M, O'Neill HC, Franklin CC. Cigarette smoke extract-induced suppression of caspase-3-like activity impairs human neutrophil phagocytosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292 : L1572–L1579.
329. Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Mitchell JD, Cosgrove GP, Brown KK, Kotzin BL, Voelkel NF, Fontenot AP. Oligoclonal CD4⁺ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 590–596.
330. Sweeney M, McDaniel SS, Platoshyn O, Zhang S, Yu Y, Capp BR, Zhao Y, Thistlethwaite PA, Yuan IX. Role of capacitative Ca²⁺ entry in bronchial contraction and remodeling. *J Appl Physiol* 2002; 92(4): 1599-1602.

331. Szulakowski P, Crowther AJL, Jiménez LA, Donaldson K, Mayer R, Leonard TB, MacNee W, Drost EM. The Effect of Smoking on the Transcriptional Regulation of Lung Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 41-50.
332. Takeyama K, Dabbagh K, Jeong SJ, Dao-Pick T, Ueki IF, Nadel JA. Oxidative stress causes mucin synthesis *via* transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol* 2000;164: 1546–1552.
333. Takahata Y, Nomura A, Takada H, Ohga S, Furuno K, Hikino S, Nakayama H, Sakaguchi S, Hara T. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol* 2004; 32: 622–629.
334. Taivans I, Isajevs S, Strazda G, Kopeika U. Smēķēšanas izraisītais iekaisuma process centrālos un perifēros elpceļos un tā saistība ar HOPS. 4. Pasaules latviešu ārstu kongress, 2005; 43.
335. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008; 9: 239-244.
336. Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Moore M, Sullivan A, Nicolls MR, Fontenot AP, Tuder RM, Voelkel NF. An animal model of autoimmune emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 734–742.
337. Terashima T, Wiggs B, English D, Hogg JC, van Eeden SF. Phagocytosis of small carbon particles (PM10) by alveolar macrophages stimulates the release of polymorphonuclear leukocytes from bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1441–1447.
338. Thornton CA, Upham JW, Wikstrom ME, Holt BJ, White GP, Sharp MJ, Sly PD, Holt PG. Functional maturation of CD4+CD25+CTLA4+CD45RA+ T regulatory cells in human neonatal T cell responses to environmental antigens/allergens. *J Immunol* 2004; 173: 3084–3092.
339. Thompson AB, Daughton D, Robbins RA, Ghafouri MA, Oehlerking M, Rennard SI. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1527-1537.

340. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; 164: 183–190.
341. To Y. Total histone deacetylase. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: A276.
342. Traves SL, Culpitt SV, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE. Increased levels of the chemokines GRO- α and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax* 2002; 57: 590–595.
343. Traves SL, Smith SJ, Barnes PJ, Donnelly LE. Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 441–450.
344. Tsuchiya K, Mulcahy RT, Reid LL, Distechi CM, Kavanagh TJ. Mapping of the glutamate cysteine ligase catalytic subunit gene (GLCLC) to human chromosome 551 6p1 2 and mouse chromosome 9D-E and of the regulatory subunit gene (GLCLR) to human chromosome 1p21-p22 and mouse chromosome 3H1-3. *Genomics* 1995; 30: 630-632.
345. Tyagi SC. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am J Physiol* 1998; 274: C396-C405.
346. Tu Z, Ader MW. Up-regulation of glutamate cysteine ligase gene expression by butylated dihydroxytoluene is mediated by transcription factor AP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 801-805.
347. Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, Flores SC. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 88–97.
348. Turato C, Zuin R, Miniati M, Baraldo S, Rea F, Beghe B, Monti S, Formichi B, Boschetto P, Harari S, Papi A, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Airway inflammation in severe chronic obstructive pulmonary disease. Relationship with lung function and radiological emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 105- 110.
349. Valacchi G, Pagnin E, Phung A, Nardini M, Schock BC, Cross CE, Van Der Vliet A. Inhibition of NF κ B Activation and IL-8 Expression in Human Bronchial Epithelial Cells by Acrolein. *Antioxidant Redox Signal* 2005; 7: 25-31.
350. Van Klaveren RJ, Demedts M, Nemery B. Cellular glutathione turnover in vitro, with emphasis on type II pneumocytes. *Eur Respir J* 1997; 10: 1392-1400.

351. van Kooyk Y, Engering A, Lekkerkerker AN, Ludwig IS, Geijtenbeek TB. Pathogens use carbohydrates to escape immunity induced by dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 488–493.
352. Van Schayck CP, Loozen JM, Wagena E, Akkermans RP, Wesseling GJ. Detecting patients at a high risk of developing chronic obstructive pulmonary disease in general practice: cross sectional case finding study. *BMJ* 2002; 324: 1370–1374.
353. van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, Hylkema MN, van der Berg A, Timens W, Kerstjens HAM. Cigarette smoke-induced emphysema: a role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 751–758.
354. van Oosterhout AJ, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *Eur Respir J* 2005; 26(5): 918-32.
355. Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J* 2007; 30: 993-1013.
356. Von Herrath MG, Harrison LC. Regulatory lymphocytes: antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 223–232.
357. Wang IM, Stepaniants S, Boie Y, Mortimer JR, Kennedy B, Elliott M, Hayashi S, Loy L, Coulter S, Cervino S, Harris J, Thornton M, Raubertas R, Roberts C, Hogg JC, Crackower M, O'Neill G, Paré PD. Gene expression profiling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 402–411.
358. Wagner H. Toll meets bacterial cpg-dna. *Immunity* 2001; 14: 499–502.
359. Wahl SM, Vazquez N, Chen W. Regulatory T cells and transcription factors: gatekeepers in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 768–774.
360. Walsh AC, Li W, Rosen DR, Lawrence DA. Genetic mapping of GLCLC, the human gene encoding the catalytic subunit of c-glutamylcysteine synthetase, to chromosome band 6p12 and characterisation of a polymorphic trinucleotide repeat within its 5'-untranslated region. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 75: 114-116.
361. Ward PA. Role of complement, chemokines and regulatory cytokines in acute lung injury. *Ann NY Acad Sci* 1996; 796: 104-112.
362. Watchorn T, Mulier B, MacNee W. Does increasing intracellular glutathione inhibit cytokine-induced nitric oxide release and NF- κ B activation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: A889.

363. Wilhelm D, Bender K, Knebel A, Angel P. The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4792-4800.
364. Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, Rodriguez MW, Favoreto S, Dolganov GM, Paquet AC, Erle DJ. A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1383–1392.
365. Wu L, Chau J, Young RP, Pokorny V, Mills GD, Hopkins R, McLean L, Black PN. Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2004; 59 (2): 126-129.
366. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16: 1643–1656.
367. Yagi O, Aoshiba K, Nagai A. Activation of nuclear factor-kappaB in airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2006; 73(5):610-6.
368. Yang L, Lian X, Cowen A, Xu H, Du H, Yan C. Synergy between signal transducer and activator of transcription 3 and retinoic acid receptor- α in regulation of the surfactant protein B gene in the lung. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 1520–1532.
369. Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, Kilty I, Rahman I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- κ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L46–L57.
370. Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I. Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release *via* RelA/p65 NF- κ B in macrophages *in vitro* and in rat lungs *in vivo*: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L567–L576.
371. Yamagata T, Sugiura H, Yokoyama T, Yanagisawa S, Ichikawa T, Ueshima K, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Yamagata Y, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M. Overexpression of CD-11b and CXCR1 on circulating neutrophils: its possible role in COPD. *Chest* 2007; 132: 890–899.

372. Yamamoto N, Homma S. Vitamin D-binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8539–8543.
373. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002; 296: 490–494.
374. Yim JJ, Park GY, Lee CT. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase M1 and T1. *Thorax* 2000; 55: 121-125.
375. Yoshikawa T, Dent G, Ward J, Angco G, Nong G, Nomura N, Hirata K, Djukanovic R. Impaired neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 473–479.
376. Yohannessen A, Omenaas E, Bakke P, Gulsvik A. Incidence of GOLD-defined chronic obstructive pulmonary disease in a general adult population. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 926–932.
377. Zemp E, Elsasser S, Schindler C, SAPALDIA team. Long-term ambient air pollution and respiratory symptoms in adults (SAPALDIA study). *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1257-1266.
378. Zhang X, Shan P, Jiang G, Cohn L, Lee PJ. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J Clin Invest* 2006; 116: 3050–3059.
379. Zhu J, Qiu Y, Valobra M, Qiu S, Majumdar S, Matin D, De Rose V, Jeffery PK. Plasma cells and IL-4 in chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1125–1133.
380. Zhu Z, Lee CG, Zheng T, Chupp G, Wang J, Homer RJ, Noble PW, Hamid Q, Elias JA. Airway inflammation and remodeling in asthma. Lessons from interleukin 11 and interleukin 13 transgenic mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164: S67–S70.
381. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, Bowen G, Rook G, Walker C. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med* 2002; 8: 625–629.
382. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J Immunol* 2004; 172:5213–5221.

383. Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, Gamble E, Matin D, Turato G, Fabbri LM, Barnes N, Saetta M, Jeffery PK. Exacerbations of bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164: 109–116.
384. Zielinski J, Bednarek M, Górecka D, Viegli G, Hurd SS, Fukuchi Y, Lai CK, Ran PX, Ko FW, Liu SM, Zheng JP, Zhong NS, Ip MS, Vermeire PA. Increasing COPD awareness. *Eur Respir J* 2006; 27: 833–852.