

Dusulio intensyvumo sąsajos su eozinofilų skaičiumi kraujyje sergant alergine astma

THE RELATIONSHIP BETWEEN DYSPNEA PERCEPTION AND BLOOD EOSINOPHIL COUNT IN ALLERGIC ASTHMA

VIRGINIJA KALINAUSKAITĖ-ŽUKAUSKĖ, DEIMANTĖ HOPPENOT, KĘSTUTIS MALAKAUSKAS
LSMU MA Pulmonologijos klinika

Santrauka. Įvadas. Greta daugelio veiksnių, galinčių įtakoti dusulio suvokimą, reikšmingos įtakos turi ir patofiziologiniai procesai, vykstantys plaučiuose, pvz., kvėpavimo takų uždegimas. Alerginės astmos patogenezėje svarbiausios uždegimo ląstelės yra eozinofilai, kurie sukelia eozinofilinį kvėpavimo takų uždegimą, pasireiškiantį padidėjusiu bronchų reaktyvumu. Iki šiol nepakankamai ištirtos dusulio intensyvumo sąsajos su kraujo eozinofilų skaičiumi sergant alergine astma. **Tikslas.** Įvertinti sergančiųjų alergine astma dusulio intensyvumo sąsajas su kraujo eozinofilų skaičiumi kraujyje prieš ir po bronchų provokacijos *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) alergenu. **Metodika.** Ištirta 11 sergančiųjų alergine astma (amžiaus vidurkis – 31,8±9,3 metų) kurių plaučių funkcija normali ir nevaržo įkvėpamųjų gliukokortikoidų. Visiems tiriamiesiems atlikti bronchų provokaciniai mėginiai su metacholinu ir *D. pteronyssinus* alergenu. Dusulio intensyvumas vertintas matuojant Borgo skale sumažėjus forsuito iškvėpimo tūriui per pirmąją sekundę (FEV₁) 20 proc. bronchų provokacijos alergenu metu (PS_{20A}). Eozinofilų skaičius kraujyje vertintas prieš ir praėjus 24 val. po bronchų provokacinio mėginio su alergenu. Gauti duomenys apdoroti statistine programa „SPSS 23.0“. **Rezultatai.** Vidutinis dusulio intensyvumas bronchų provokacijos su alergenu metu (PS_{20A}) buvo 2,97±2,31. Vidutinis kraujo eozinofilų skaičius prieš provokacinį mėginį alergenu buvo 0,36±0,25×10⁹/l, po provokacinio mėginio jų skaičius reikšmingai padidėjo iki 0,51±0,21×10⁹/l ($p = 0,046$). Nustatytos statistiškai reikšmingos sąsajos tarp PS_{20A} ir eozinofilų skaičiaus kraujyje prieš provokaciją alergenu ($R = -0,651$, $p = 0,030$) ir 24 val. po jos ($R = -0,607$, $p = 0,048$). **Išvados.** Nustatyta atvirkštinė sąsaja tarp PS_{20A} ir eozinofilų skaičiaus prieš ir po provokacijos *D. pteronyssinus* alergenu. Taigi, ryškėjant sisteminiam eozinofiliniam uždegimui, blogėja dusulio suvokimas, o tai gali būti sunkaus alerginės astmos paūmėjimo rizikos veiksnys.

Reikšminiai žodžiai: astma, dusulio suvokimas, eozinofilai, bronchų provokacija alergenu.

Summary. Introduction. In addition to the many factors that can affect perception of the dyspnea, airway inflammation also has a significant effect. The most important inflammatory cells in the pathogenesis of allergic asthma are eosinophils, which causes inflammation of the respiratory tract, manifested by increased bronchial reactivity. Unfortunately, the relationship between the dyspnea perception and eosinophils count in peripheral blood in allergic asthma has not been yet adequately investigated. **Aim.** To evaluate the association between the dyspnea perception and blood eosinophil count before and after the bronchial allergen challenge in patients with allergic asthma. **Methodology.** Eleven allergic asthma patients (mean age 31.8±9.3 years) with normal lung function and free of inhaled steroids were examined. All patients underwent bronchial challenges with methacholine and *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) allergen. Dyspnea perception was evaluated using the Borg Scale to calculate a perception score at a 20% decrease in FEV₁ during allergen challenge test PS_{20A}. Eosinophils from peripheral blood were evaluated before and 24 h after bronchial allergen challenge. **Results.** Mean dyspnea perception during allergen challenge test (PS_{20A}) was 2.97±2.31. The mean blood eosinophil count before allergen inhalation challenge test was 0.36±0.25×10⁹/l, after provocation test it significantly increased up 0.51±0.21×10⁹/l ($p = 0.046$). Statistically significant relationships were found between PS_{20A} and eosinophil count in peripheral blood before ($R = -0.651$, $p = 0.030$) and 24 h after allergen challenge ($R = -0.607$, $p = 0.048$). **Conclusions.** The inverse relationship between PS_{20A} and eosinophil count before and after allergen *D. pteronyssinus* challenge test was determined. In this way, when systemic eosinophilic inflammation is developing, the dyspnea perception is deteriorating, which can be a risk factor for a severe allergic asthma exacerbation.

Key words: asthma, dyspnea perception, eosinophils, bronchial allergen challenge.

IVADAS

Dusulys – tai grėsmingas simptomas, apibūdinamas kaip pasunkėjęs kvėpavimas arba kvėpavimo diskomforto jausmas, pasireiškiantis sergant įvairiomis, dažniausiai kvėpavimo sistemos ligomis. Dusulio suvokimui reikšmės turi daugelis veiksnių, pvz., lytis, amžius, atsvaris, fizinis parengtumas, psichologinė būklė, gretutinės ligos ir pan. Atlikti tyrimai rodo, kad patofiziologiniai procesai plaučiuose, įskaitant ir kvėpavimo takų uždegimą, gali įtakoti dusulio suvokimą [1–3].

Priepuolinis dusulys yra vienas būdingų astmos klinikinių simptomų. Astma žymiai pablogina sergančiojo gyvenimo kokybę (mažėja gebėjimas susikaupti, darbo našumas, didėja nedarbo dienų skaičius), o kartais ligos paūmėjimas gali sukelti net mirtį. Nepaisant plataus vaistų pasirinkimo, išlieka sunkios, blogai kontroliuojamos, nuolat paūmėjančios astmos atvejų. Daugėja įrodymų, kad tam įtakos turi sutrikęs dusulio suvokimas [1, 4–6]. Manoma, kad blogas dusulio suvokimas yra susijęs su padidėjusia astmos paūmėjimo rizika, nes būklės blogėjimas neįjuntamas arba juntamas neadekvačiai, todėl laiku nesikreipiama medicininės pagalbos [5].

Pastebėta, kad netgi panašaus sunkumo astma sergantys asmenys dusulį suvokia skirtingai [2, 7]. Dominuoja tendencija, kad sergantiesiems sunkia astma, ryškesnė bronchų obstrukcija kliniškai pasireiškia silpnesniu dusuliu [2, 4, 9]. Tai bandoma paaiškinti dominuojančiu eozinofiliniu kvėpavimo takų uždegimu [6]. Pastebėta, kad skreplių eozinofilija ir padidėjęs eozinofilų kiekis bronchų biopsiatuose yra susijęs su dusulio suvokimu [2, 8, 9]. Ar dusulio intensyvumo suvokimas gali priklausyti nuo sisteminio eozinofilinio uždegimo, sergant astma, nėra aišku. Todėl šio tyrimo tikslas – įvertinti sergančiųjų alergine astma dusulio intensyvumo sąsajas su periferinio kraujo eozinofilų skaičiumi. Tuo tikslu tiriamiesiems buvo provokuojama ūminė bronchų obstrukcija įkvėpamuju *Dermaphagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) alergenu.

METODIKA

Į tyrimą įtraukti 18–50 metų asmenys, sergantys alergine astma, turintys įsijautrinimą *D. pteronyssinus* alergenui ir ne trumpiau kaip 1 mėn. nevartoję įkvėpamųjų gliukokortikoidų. Visiems tiriamiesiems astmos simptomai pasireiškė ne trumpiau kaip vienerius metus, o per pastarąjį mėnesį iki pasirašant dalyvavimo tyrime sutikimo formą nebuvo astmos paūmėjimų būdingų simptomų.

Pirmo vizito metu visiems tiriamiesiems buvo atlikta spiograma, bronchų provokacinis mėginys su metacholinu ir alerginiai odos dūrio mėginiai. Antras vizitas įvyko vienos savaitės laikotarpiu po pirmojo, kurio metu buvo atliekamas bendrasis kraujo tyrimas, bron-

chų provokacinis mėginys su *D. pteronyssinus* alergenu. Praėjus 24 val. po provokacinio mėginio su alergenu, pakartotinai atliktas bendrasis kraujo tyrimas. Dusulio intensyvumas provokacinio mėginio su alergenu metu buvo vertinamas pagal Borgo skalę.

Įsijautrinimas *D. pteronyssinus* alergenu (Stallergenes S.A., Prancūzija) vertintas atliekant odos dūrio mėginius (lašinant alergeną ant vidinio dilbio odos, 3 cm atstumu ir per lašą praduriant epidermį su specialia adatėle). Mėginio teigiamai kontrolei naudotas 10 mg/ml histamino tirpalas, neigiamai kontrolei – alergenų diagnostinio tirpalo skiediklis. Odos reakcija vertinta po 15 min., liniuote išmatuojant didžiausią ir jam statmeną pūkslės skersmenį bei apskaičiuojant aritmetinį jų vidurkį (mm). Mėginys vertintas teigiamu, kai vidutinis pūkslės dydis didesnis nei 3 mm.

Plaučių funkcija vertinta atliekant spiogramą su „CustoVitM“ spirometru (Custo Med; Munchen, Vokietija).

Bronchų provokacinis mėginys su metacholinu atliktas rezervuariniu metodu (Provocations Test I, Pari, Vokietija), pradėdamas nuo 15 µg metacholino ir kas 5 min. šią dozę didinant du kartus iki suminės į plaučius patenkančios 1929 µg metacholino dozės. Po kiekvienos įkvėptos metacholino dozės, praėjus 30 ir 90 sek., tiriamiesiems atlikta spiograma ir vertintas forsuoto iškvėpimo tūrio per pirmąją sekundę (FEV₁) pokytis. Tyrimas nutrauktas FEV₁ sumažėjus 20 proc. nuo pradinio dydžio ar atsiradus subjektyviai netoleruojamam dusuliui. Padidėjęs bronchų reaktyvumas vertintas apskaičiuavus provokacinę metacholino dozę (PD_{20M}), sumažinančią FEV₁ 20 proc. nuo pradinio FEV₁ dydžio. Metacholino mėginys naudotas kaip astmos diagnostinis tyrimas.

Bronchų provokacinis mėginys su specifiniu *D. pteronyssinus* alergenu atliktas su skirtingomis specifinio alergeno (Stallergenes S.A., Prancūzija) tirpalo koncentracijomis (0,01 IR/ml, 0,1 IR/ml, 1,0 IR/ml, 10 IR/ml, 33,3 IR/ml), naudojant „KoKo DigiDoser“ purkštuvą (Sunrise Medical, Somerset, PA, JAV). Liofilizuotas alergenų ekstraktas skiestas 0,9 proc. natrio chlorido tirpalu. Po kiekvienos įkvėptos alergeno dozės praėjus 10 min., atlikta spiograma ir vertintas FEV₁ pokytis. Tyrimas nutrauktas FEV₁ sumažėjus 20 proc. nuo pradinio dydžio arba atsiradus subjektyviai netoleruojamam dusuliui. Padidėjęs bronchų reaktyvumas vertintas apskaičiuavus provokacinę metacholino dozę (PD_{20A}), sumažinančią FEV₁ 20 proc. nuo pradinio FEV₁ dydžio.

Bronchų provokacinio mėginio su alergenu metu dusulys vertintas balais pagal Borgo skalę kiekvieną kartą prieš atliekant spiogramas po alergeno dozių sukvėpavimo praėjus protokole numatytam laikotarpiui. Dusulio intensyvumas FEV₁ sumažėjus 20 proc. nuo pradinio dydžio bronchų provokacijos alergenu

1 lentelė. Tiriamųjų demografiniai ir klinikiniai duomenys

Tiriamasis	Lytis (V/M)	Amžius (metai)	Pradinis FEV ₁ (litrai)	Pradinis FEV ₁ (proc. normos)	PD _{20M} (mg)	Pūkšlės į <i>D. pterony-sinnus</i> alergena vidutinis skersmuo (mm)	Eozinofilų skaičius kraujyje prieš provokaciją alergenu, (×10 ⁹ /l)	Eozinofilų skaičius kraujyje po provokacijos alergenu, (×10 ⁹ /l)
1	M	48	3,37	127	0,090	4,0	0,53	0,61
2	V	30	4,55	100	0,210	4,0	0,18	0,40
3	M	41	2,79	96	0,073	5,0	0,35	0,49
4	M	27	3,53	109	0,290	6,0	0,10	0,17
5	V	22	5,17	98	0,092	6,5	0,13	0,50
6	V	44	2,70	81	0,055	4,5	0,39	0,65
7	M	24	3,88	113	0,353	6,5	0,65	0,72
8	V	20	2,44	73	0,016	4,0	0,89	0,83
9	M	27	3,57	105	0,070	8,0	0,30	0,25
10	M	31	3,50	102	0,074	4,0	0,24	0,65
11	M	36	4,49	139	0,095	5,0	0,17	0,33
Vidurkis ± SN		31,8±9,3	3,64±0,86	104±19	0,129±0,107	5,5±1,3	0,36±0,25	0,51±0,21

FEV₁ – forsuoto iškvėpimo tūris per pirmąją sekundę; SN – standartinis nuokrypis.

metu (PS_{20A}) apskaičiuotas pagal linijinės interpoliacijos metodą.

Eozinofilų skaičius kraujyje tirtas iš periferinio kraujo, paimto prieš ir 24 val. po bronchų provokacinio mėginio su alergenu.

Gauti duomenys apdoroti statistine programa „SPSS 23.0“. Gauti duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Vidurkių skirtumo statistinis reikšmingumas vertintas pagal Stjudento (t) kriterijų, koreliacija – pagal Spearmanno koreliacijos koeficientą. Rezultatai vertinti kaip statistiškai patikimi, kai $p \leq 0,05$.

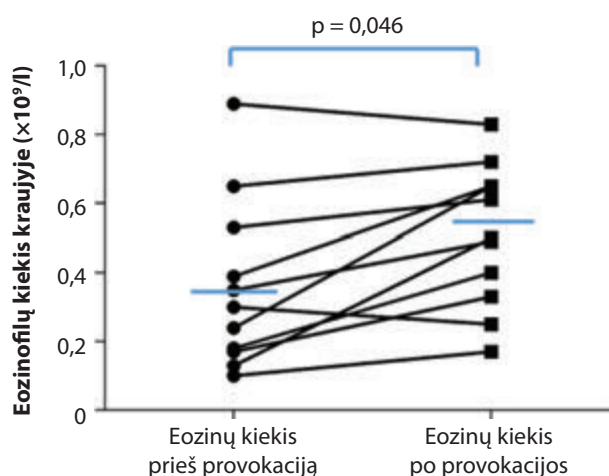
REZULTATAI

Ištirta 11 alergine astma sergančių asmenų, kurių demografiniai ir klinikiniai duomenys pateikiami 1 lentelėje.

Vidutinis kraujo eozinofilų skaičius prieš bronchų provokacinį mėginį specifiniu alergenu buvo $0,36 \pm 0,25 \times 10^9/l$, po provokacinio mėginio specifiniu alergenu eozinofilų skaičius kraujyje reikšmingai padidėjo iki $0,51 \pm 0,21 \times 10^9/l$ ($p = 0,046$) (1 pav.).

Dusulio suvokimas bronchų provokacijos alergenu metu (PS_{20A}) buvo $2,97 \pm 2,31$ (mažiausia PS_{20A} reikšmė – 1,31, didžiausiai – 5,24).

Nustatyta vidutinio stiprumo atvirkštinė koreliacija tarp prieš ir po bronchų provokacijos alergenu kraujyje esančių eozinofilų skaičiaus ir dusulio intensyvumo PS_{20A} (atitinkamai – $R = -0,651$, $p = 0,030$ ir $R = -0,607$, $p = 0,048$) (2 pav.).

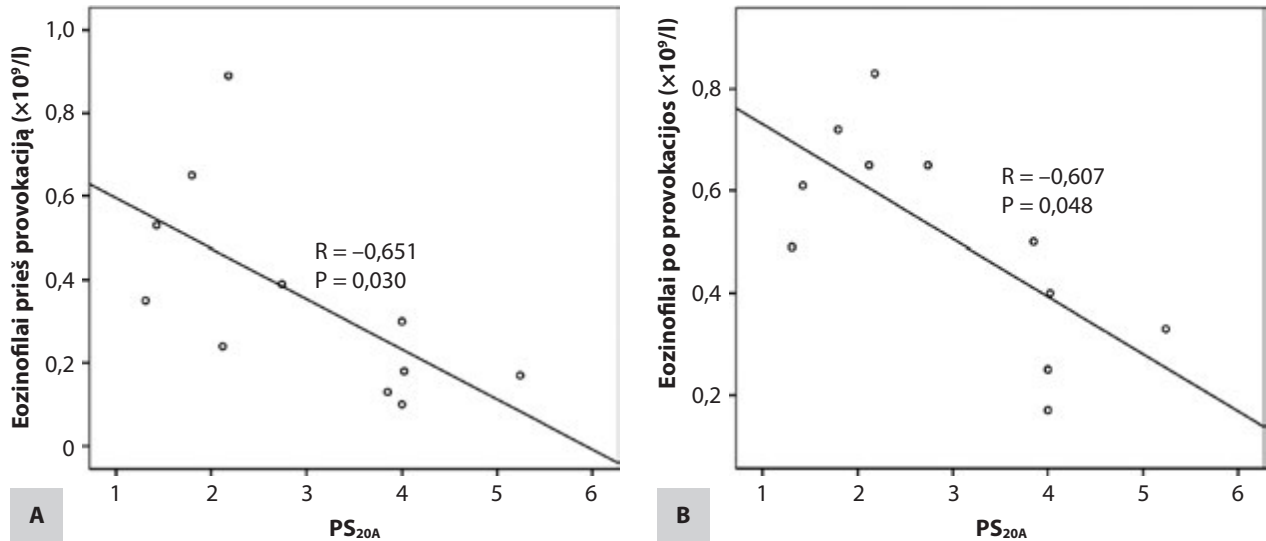


1 pav. Eozinofilų kiekis kraujyje prieš ir po bronchų provokacijos alergenu

APTARIMAS

Atlikto tyrimo duomenimis, dusulio suvokimas susijęs su periferinio kraujo eozinofilų skaičiumi sergant alergine astma. Nustatyta, kad, didėjant eozinofilų skaičiui kraujyje, silpnėja dusulio intensyvumo suvokimas. Taigi, ryškėjant sisteminiam eozinofiliniam uždegimui, blogėja dusulio suvokimas, o tai gali būti sunkaus alerginės astmos paūmėjimo rizikos veiksnys.

Dusulio suvokimą lemia keletas kvėpavimo patofiziologinių mechanizmų: plaučių hiperinfliacija, padidėjęs kvėpavimo darbas dėl aktyviamų kvėpa-



2 pav. A) koreliacija tarp PS_{20A} ir eozinofilų skaičiaus kraujyje prieš bronchų provokaciją alergenu; B) koreliacija tarp PS_{20A} ir eozinofilų kiekio kraujyje 24 val. po bronchų provokacijos alergenu.

PS_{20A} – dusulio intensyvumas FEV₁ sumažėjus 20 proc. nuo pradinio dydžio bronchų provokacijos alergenu metu.

vimo raumenų proprioreptorių, tiesioginio kvėpavimo takų mechanoreptorių stimuliavimo [1, 10–13]. Dusulio suvokimui reikšmingos įtakos turi ir eozinofilinis kvėpavimo takų uždegimas [1, 3, 14]. Žinoma, kad aktyvuoti eozinofilai išskiria neurotoksinus, kurie veikia aferentinius nervus, dalyvaujančius dusulio suvokime [12]. Smulkiųjų kvėpavimo takų uždegiminis procesas didina plaučių hiperinfliaciją ir ankstyvą kvėpavimo takų užsidarymą [1, 10–13]. Įrodyta, kad pacientams, sergantiems sunkia astma su pasikartojančiais paūmėjimais, smulkiųjų kvėpavimo takų obstrukcija buvo ryškesnė [1]. Todėl dusulio suvokimo skirtumus būtų galima paaiškinti eozinofilinio uždegimo aktyvumo skirtumais priklausomai nuo astmos sunkumo [14]. Įrodyta, kad skrepliuose ir bioptatuose randama eozinofilija, sergant sunkia astma, susijusi su dusulio suvokimu ir yra ligos blogos kontrolės rodiklis [8, 15–17].

Dusulio suvokimą gali įtakoti daugelis veiksnių, pvz.: vyresnis amžius, ilgalaikio astmos gydymo metu mažėjantis jautrumas periferiniams dusulio signalams, moteriškoji lytis, gretutinės ligos, ypač depresija [6–9], tačiau mūsų tyrime šie veiksniai negalėjo įtakoti rezultatų dėl jauno tiriamųjų amžiaus ir santykinai trumpo ligos simptomų pasireiškimo laikotarpio, gretutinių ligų nebuvimo, o vyrų ir moterų proporcijos pasiskirstė tolygiai. Tyrime dalyvavę pacientai nebuvo gydyti įkvepiamaisiais gliukokortikoidais, kas galėtų iškreipti eozinofilų, kaip pagrindinių astmos patogenezės būdingo lėtinio uždegimo ląstelių, aktyvumą ir funkcijas.

Nėra duomenų vertinant kraujo eozinofilų skaičių ir ieškant galimų sąsajų su dusulio intensyvumo suvokimu. Nors įrodyta, kad kvėpavimo takų uždegimas atlieka svarbų vaidmenį sutrikdant (silpninant) dusulio suvokimą, esant aktyviam dominuojančiam

eozinofiliniam uždegimui kvėpavimo takuose [2], tačiau eozinofilų įtaka dusulio suvokimui vertinta ne pagal periferinio kraujo, bet skrepliuose, plaučių bioptatuose randamą eozinofilų kiekį. Pirmą kartą sutrikusį dusulio suvokimą, sergant sunkios eigos astma, tyrė Veen JC su bendraautoriais [1], kurie nustatė, kad sunkia astma su dažniais paūmėjimais ir stabilios eigos astma sergantis asmuo blogiau suvokia dusulį (vertintą bronchų provokacijos metacholinu metu). Lyginant sunkia, tačiau stabilios eigos, ir sunkia, bet su dažniais paūmėjimais astma sergančiuosius, pastaroji grupė dusulį suvokė silpniau. Šio tyrimo metu nustatyta ir atvirkštinė vidutinio stiprumo koreliacija su eozinofilų kiekiu skrepliuose ir dusulio suvokimu [1, 15–17]. Todėl galima daryti išvadą, kad pacientai, sergantys sunkia astma, ypač esant vis pasikartojantiems paūmėjimams, tarsi adaptuojasi juntamam dusuliui, pradeda priimti tai kaip normą, todėl sunkiau atskiria dusulio pasunkėjimą, blogiau suvokia dusulį, kuris susijęs su skrepliuose nustatomu eozinofilų kiekiu [1, 2, 16].

Šio tyrimo rezultatai, atliekant bronchų provokaciją specifiniu alergenu ir vertinant periferinio kraujo eozinofilų kiekį bei dusulio suvokimą, atkartojo rezultatus, gautus atliekant tyrimus, vertinusius eozinofilų kiekio skrepliuose, plaučių bioptatuose sąsajas su dusulio suvokimu. Tai rodo, kad eozinofilai aktyvinami visame organizme, kaip sisteminis atsakas, ne vien kvėpavimo takuose, ir nėra nulemta vien lokaliai padidėjusios eozinofilų migracijos į kvėpavimo takus. Šio tyrimo privalumas buvo ir tai, kad panaudodami ūminės alerginės astmos modelį provokuojant įkvepiamoju alergenu *in vivo*, imitavome natūralią klinikinę situaciją, kai įprastai šiam tikslui naudojamas nespecifinis bronchų provokacinis mėginys su metacholinu.

IŠVADOS

Nustatyta, kad alerginės astmos metu dusulio intensyvumo suvokimas turi atvirkštinę ryšį su periferinio kraujo eozinofilų skaičiumi prieš ir po provokacijos *D. pteronyssinus* alergenu. Tai rodo, kad dusulio suvokimas yra silpnesnis, ryškėjant sisteminiam eozinofiliniam uždegimui. Nepakankamas dusulio suvokimas gali būti astmos paūmėjimo rizikos veiksnys, dėl to šie pacientai turėtų būti atidžiai sekami ir adekvačiai gydomi.

Gauta 2017 09 14

Priimta 2017 09 22

LITERATŪRA

1. Veen JC, Smits HH, Ravensberg AJ, Hiemstra PS, Sterk PJ, Bel EH. Impaired Perception of Dyspnea in Patients with Severe Asthma Relation to Sputum Eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 158: 1134-41.
2. Barbaro MP1, Lacedonia D, Palladino GP, Bergantino L, Ruggeri C, Martinelli D et al. Dyspnea perception in asthma: Role of airways inflammation, age and emotional status. *Respir Med*, 2011; 105:195-203.
3. Nosedá A. Dyspnoea and perception of airway obstruction. *Review. Rev Mal Respir*, 2003; 20:364-72.
4. Stravinskaite KI, Malakauskas K, Sitkauskiene B, Sakalauskas R. Perception of Dyspnea in Asthmatics with normal lung function. *Medicina*, 2005; 41:747-53.
5. Malakauskas K, Ragaisiene S, Sakalauskas R. Perception of acute airway function changes by patients with mild asthma. *Allergy Asthma Proc*, 2009; 30:277-83.
6. Malakauskas K, Sitkauskiene B, Stravinskaite K, Sakalauskas R. Dyspnea perception and reversibility of methacholine-induced unlimited airway narrowing in asthmatics. *J Asthma*, 2006; 43:463-67.
7. Martinez-Moragon E, Perpina M, Belloch A, de Diego A, Martinez-Frances ME. Asthma patients' perception of dyspnea during acute bronchoconstriction. *Arch Bronconeumol* 2003; 39:67-73.
8. Burki NK, Lee L-Y. Mechanism of Dyspnea. *Chest*, 2010; 138:1196-1201.
9. Jang AS, Choi IS. Relationship between the perception of dyspnoea and airway inflammatory markers. *Respir Med*, 2002; 96:150-54.
10. Gigliotti F. Mechanism of Dyspnea in Healthy Subjects. *Multidiscip Respir Med*, 2010; 5:195-201.
11. Parshall MB, Schwartzstein RM, Adams L, Banzett RB, Manning HL, Bourbeau J et al. American Thoracic Society Committee on Dyspnea. An official American Thoracic Society statement: update on the mechanisms, assessment, and management of dyspnea. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185:435-52.
12. Undem BJ, Nassenstein C. Airway nerves and dyspnea associated with inflammatory airway disease. *Respir Physiol Neurobiol* 2009; 167:36-44.
13. Weatherald J, Loughheed MD, Taillé C, Garcia G. Mechanisms, measurement and management of exertional dyspnoea in asthma. *Eur Respir Rev*, 2017; 26: 170015;
14. Lu Y, Sjöstrand M, Malmhäll C, Rådinger M, Jeurink P, Lötval J, Bossios A. New production of eosinophils and the corresponding TH1/TH2 balance in the lungs after allergen exposure in BALB/c and C57BL/6 mice. *Scand J Immunol*, 2010; 71:176-85.
15. Rutgers SR, ten Hacken NH, Koeter GH, Postma DS. Borg scores before and after challenge with adenosine 5'-monophosphate and methacholine in subjects with COPD and asthma. *Eur Respir J*, 2000; 16:486-90.
16. Rosi E, Stendardi L, Binazzi B, Scano G. Perception of Airway Obstruction and Airway Inflammation in Asthma: A Review. *Lung*, 2006; 184:251-58.
17. van den Toorn LM, Overbeek SE. Prins JB et al. Dyspnoea perception during clinical remission of atopic asthma. *Eur Respir J*, 2002; 19: 1047-1050.