

Rezumatul tezei de doctorat

Cercetări epidemiologice și funcționale privind hiperreactivitatea bronșică în mediul industrial

Doctorand **Andreea – Iulia Socaciu**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Aristotel Cocârlă**

Cluj-Napoca, 2013

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Definiția și clasificarea hiperreactivității bronșice	17
2. Prevalența hiperreactivității bronșice	19
3. Etiologia hiperreactivității bronșice	21
4. Patogenia hiperreactivității bronșice (Inflamația căilor aeriene)	25
5. Diagnosticul hiperreactivității bronșice	33
6. Consecințele inflamației căilor aeriene	35
6.1 Remodelarea căilor aeriene	35
6.2 Declinul funcției ventilatorii	37
6.3 Obstrucția căilor aeriene	39
7. Chestionarele de simptome respiratorii în studiile epidemiologice ale hiperreactivității bronșice	41
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective (generale și specifice)	47
2. Metodologie generală de cercetare	49
3. Studiul I. Validarea chestionarului de simptome respiratorii ECRHS II	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru	51
3.3. Material și metodă	51
3.4. Rezultate	53

3.5. Discuții	67
3.6. Concluzii	71
4. Studiul II. Hiperreactivitatea bronșică și declinul funcției ventilatorii la muncitorii dintr-o turnătorie	73
4.1. Introducere	73
4.2. Ipoteza de lucru	73
4.3. Material și metodă	73
4.4. Rezultate	78
4.5. Discuții	96
4.6. Concluzii	101
5. Discuții generale	103
6. Concluzii generale	109
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	111
REFERINȚE	113
ABREVIERI	11

Cuvinte cheie: hiperreactivitate bronșică, chestionar de simptome respiratorii ECRHS II, declin VEMS, test PD₂₀ VEMS histamină, expunere cumulativă la pulberi.

Introducere

Publicațiile din domeniul pneumologiei au acordat în ultimele trei decade un spațiu generos dedicat hiperreactivității bronșice (HRB). Se cristalizează din ce în ce mai mult faptul că, din punct de vedere etiopatogenetic, afecțiunile bronhopulmonare nespecifice au ca element funcțional comun o reactivitate bronșică crescută. Această HRB, dobândită adesea din fragedă copilărie, asociată sau nu cu simptome clinice, se poate valida cel mai frecvent în domeniul astmului bronșic și al bronșitei cronice. Cunoașterea acestei condiții funcționale patologice este deosebit de importantă în ipostaza prezenței sale ca element de anticipare a astmului bronșic și BPCO, deoarece marchează momentul adoptării de măsuri igienice și medicale de la care se așteaptă o ameliorare a evoluției spre entități clinice.

Studiile asupra HRB dobândite în mediul ocupațional sunt, până în prezent mai puține, iar rezultatele pe măsura preocupărilor. Există diferențe importante în ce privește condiționarea HRB observată curent în practică și cea din mediul industrial. La baza ambelor stă inflamația căilor aeriene și consecințele acesteia: remodelarea, obstrucția căilor aeriene și declinul funcției ventilatorii.

Existența unui număr mare de subiecți cu HRB asimptomatică presupune un important factor de risc și anume, persistența fenomenului de remodelare, cronicizarea infiltratului celular și proliferarea colagenă în pereții bronșici, evoluând în timp spre o obstrucție cronică a căilor aeriene fără a fi însoțită de avertismente clinice. Din aceste motive, pare rațională o monitorizare clinico-funcțională a personalului expus riscurilor din mediul industrial, căutând prin evaluări ale declinului funcțional și ale HRB, subiecții destinați unor programe speciale adresate conservării funcției respiratorii.

Stadiul actual al cunoașterii

Definiția, prevalența și etiologia hiperreactivității bronșice.

HRB se definește ca o anomalie a căilor aeriene care permite acestora să se îngusteze rapid și excesiv consecutiv acțiunii unor stimuli nespecifici². Deși HRB reprezintă trăsătura esențială a astmului bronșic, ea nu este specifică acestuia fiind prezentă și în obstrucția cronică a căilor aeriene⁴, în rinita cronică⁵, în infecțiile tractului respirator superior⁶, în cursul refluxului gastro-esofagian și chiar la indivizi asimptomatici cu funcție respiratorie normală⁷.

Datele privitoare la prevalența HRB sunt diferite de la un autor la altul în funcție de populația luată în studiu. Pe diferite loturi studiate, HRB este estimată între 10% și 25%^{13,14,15} prevalențe mult superioare celor cunoscute în astmul bronșic, situate puțin peste 5% din populația generală¹⁶.

HRB, ca expresie a tulburării motricității bronșice, are la bază inflamația căilor aeriene și presupune participarea unor factori endogeni (predispozanți) și exogeni (determinanți).

Dintre factorii endogeni, cei mai importanți sunt cei de natură genetică. Principalul factor endogen câștigat pe parcursul vieții derivă din contractarea unor infecții repetitive ale căilor respiratorii. Alți factori endogeni sunt vârsta, domeniu larg deschis cercetării, și sexul, referitor la care există studii contradictorii^{26,27}. Între factorii endogeni, starea atopică deține un rol primordial în dezvoltarea HRB. Studiile populaționale au revelat că 85% până la 90% dintre adulții și copiii bine documentați ca astmatici au prezentat stare atopică asociată cu HRB severă²⁸.

Factorii exogeni sunt numeroși și de origini diferite: infecții recurente ale căilor respiratorii, expunerea la iritanți și sensibilizanți de natură domestică, ocupațională sau ambientală, micro și macroclimatul, condițiile socioeconomice, nivelul cultural educativ, efortul fizic mare etc. Un loc aparte îl deține fumatul activ și pasiv^{11,30,31,32,33,34}.

Patogenia hiperreactivității bronșice

Substratul HRB este inflamația căilor aeriene care constă într-o creștere a numărului de celule activate la nivelul mucoasei și în lumenul bronșic. Infiltratul inflamator se menține într-o formă cronică și este „reîmprospătat” prin contactul cu agenții care l-au provocat.

În funcție de agentul (agenții) etiologici care provoacă inflamația căilor aeriene aceasta poate fi de natură infecțioasă, alergică sau neurogenă. *Inflamația alergică* presupune un proces de pregătire prin sensibilizare la alergeni și un răspuns imunologic de tip I la un nou contact cu aceștia, în urma cărui proces inflamația căilor aeriene se va perpetua. *Inflamația neurogenă* este consecința expunerii la iritanți respiratori, în general substanțe cu greutate moleculară mică și este regizată în mare măsură de către sistemul nonadrenergic noncolinergic (NANC) la care se asociază în unele cazuri un proces de neuromodulare colinergică iar cea *infecțioasă* reprezintă în cele mai multe cazuri o stare efemeră, care duce la o HRB tranzitorie. Indiferent de mecanismul inflamației, în final se constituie un infiltrat celular activat cu competențe secretorii și proliferative care instaurează HRB.

Diagnosticul hiperreactivității bronșice

Diagnosticul HRB are ca „standard de aur” testul de provocare inhalatorie nespecifică (aplicat extensiv) care utilizează diverși agenți: farmacologici (histamină, metacolină), aerosoli hipertonici, inhalare de aer rece/uscă, efort fizic, hiperventilația izocapnică etc. Rezultatele pozitive înregistrate nu semnifică existența astmului bronșic. Ele confirmă prezența HRB dar nu certifică astmul bronșic pentru care reprezintă doar unul din criteriile de evaluare.

Consecințele inflamației căilor aeriene

Evaluarea procesului inflamator se bucură de un interes deosebit, atât pentru diagnostic cât și pentru urmărirea în timp a evoluției subiectului afectat, inclusiv ca și criteriu de eficiență a tratamentului aplicat. Prezența procesului inflamator la nivelul căilor aeriene determină trei categorii de fenomene patologice intim corelate. Primul este HRB, al doilea este remodelarea căilor aeriene (RCA) constituită ca substrat al hiperreactivității și, al treilea fenomen este obstrucția căilor aeriene care se instalează pe fondul unei rate crescute a declinului funcțional.

RCA este un proces dinamic, inițiat de inflamație, având ca expresie modificări structurale ale pereților bronșici constând în îngroșarea acestora, leziuni ale epiteliului, hiperplazia și hipertrofia celulelor musculare netede, proliferarea fibroblaștilor și a celulelor caliciforme asociate cu angiogeneză^{59,60,61}.

Cunoașterea ratei anuale de declin a VEMS (Δ VEMS) este o practică facilă și extrem de utilă. Acest parametru ventilator, VEMS, evoluează fiziologic în raport cu vârsta, astfel că după 30 de ani scade gradat⁶⁵ cu o rată anuală evaluată la 25ml/an⁶⁶ condiționată de factori individuali, genetici, vârstă, obiceiul de a fuma și expunerea ambientală și ocupațională la alergeni și substanțe iritante.

Chestionarele de simptome respiratorii în studiul hiperreactivității bronșice

Până în prezent, pentru evaluarea HRB s-au aplicat chestionare de simptome respiratorii în variante originale sau modificate și chestionare de concepție proprie a autorilor. Indiferent de originea chestionarului, valoarea diagnostică se stabilește prin validarea sa, fie în contextul astmului, fie prin confruntare cu testul farmacologic.

Studiul I. Validarea chestionarului de simptome respiratorii ECRHS II

Scopul și obiectivele studiului

Principalul obiectiv al acestui studiu constă în validarea chestionarului ECRHS II, chestionar recomandat de Uniunea Europeană, punând față în față simptomele culese pe baza aplicării acestuia, cu datele obținute la aceiași subiecți la testul inhalator cu histamină (PD_{20} VEMS). Scopul final al acestui studiu constă în a da răspuns la întrebarea, dacă acest chestionar poate fi considerat ca satisfăcător în studiul HRB în cadrul unor colectivități din mediul industrial.

În studiul de validare a chestionarului ECRHS II au fost selecționați 278 subiecți din care 194 femei și 83 bărbați care s-au prezentat la Clinica de Medicina Muncii din Cluj-Napoca în intervalul 2007-2010 pentru evaluarea unor simptome respiratorii. Lotul a fost selecționat pe baza următoarelor criterii: prezența unor simptome respiratorii pentru care pacienții nu au mai fost investigați în alte servicii medicale, nefiind diagnosticați cu astm bronșic până la data admiterii în clinică.

Criteriile de excludere din lot au fost: prezența hipertensiunii arteriale, a cardiopatiei ischemice, un VEMS mai mic de 70% din valoarea de predicție la explorarea funcțională ventilatorie bazală, existența unei pneumoconioze și prezența în ultimele 4 săptămâni a unor infecții ale căilor respiratorii superioare. Subiecții care au dat răspuns pozitiv la item Q14 (Ați avut vreodată astm bronșic?) nu au fost incluși în lot.

Material și metode

Chestionarul ECRHS II s-a aplicat parcurgându-se itemii Q1 (Q1, Q1.1, Q1.2), Q2-Q7, Q8 (Q8, Q8.1), Q9, Q10 (Q10, Q10.1), Q11, Q12 (Q12, Q12.1, Q12.1.1), Q13, Q14 pentru simptome respiratorii și itemii Q74 (Q74, Q74.1, Q74.2.1, Q74.3, Q74.3.2.1) și Q75.1 pentru evaluarea fumatului. Toți subiecții au fost examinați clinic, s-a măsurat tensiunea arterială, s-a efectuat electrocardiograma, radiografia pulmonară standard și explorarea funcției ventilatorii bazale, investigații care au constituit criterii obiective la constituirea lotului.

Testul inhalator cu histamină s-a efectuat prin aplicarea metodei PD_{20} VEMS care cuantifică doza de histamină necesară unei reduceri standard a VEMS cu 20% din valoarea de pretestare.

Testul a început cu determinarea parametrilor ventilatori bazali după care, cu ajutorul dozimetruului s-a administrat aerosolul din soluția tampon fosfat, urmat de o nouă determinare a expirogramei forțate. Dacă după administrarea soluției tampon fosfat nu s-au produs scăderi ale VEMS mai mari de 8-10% s-a trecut la administrarea aerosolului de histamină, considerându-se ca probatorie pentru prezența HRB valori ale PD_{20} VEMS mai mici de 7,8 μ mol.

Evaluarea stării atopice: identificarea pacienților cu teren atopic s-a făcut cu ajutorul testelor cutanate prick la pneumoalergeni habituali. Interpretarea testelor s-a realizat ținând cont de reactivitatea cutanată la markeri de control, unul negativ (ser fenolat) și unul pozitiv (histamină 1%). S-au aplicat picături de alergen pe fața anterioară a antebrațului la distanță de cel puțin 3 cm între ele și s-a efectuat prin fiecare picătură o înțepare strict la nivel epidermic cu o lanțetă prick. Testul a fost considerat pozitiv dacă la 15 minute de la aplicare a apărut o papulă de cel puțin 3 mm diametru, de obicei însoțită de eritem și prurit la unul sau la mai mulți alergeni.

Obiceiul de a fuma s-a consemnat atât ca aspect calitativ, dar a fost calculat și cantitativ ca indice de fumat după formula: "număr de țigări fumate pe zi x numărul anilor de fumat / 20".

Testele statistice au fost aplicate la un prag de semnificație de 5% iar prelucrarea datelor s-a realizat cu programul SPSS v16 iar reprezentările grafice au fost realizate cu Microsoft Excel.

Rezultate și discuții

Pacienții incluși în lotul de validare a chestionarului sunt adulți de vârstă mijlocie, cu diferențe ne semnificative în funcție de rezultatul testului inhalator cu histamină. În seria noastră de observații, HRB s-a constatat cu o frecvență mai mult decât dublă în rândul femeilor comparativ cu bărbații, similar altor studii^{10,26}.

În privința relației dintre HRB și starea atopică, studiul nostru a constatat o proporție practic egală a subiecților atopici în cele două grupe de răspuns la testul inhalator cu histamină: PD₂₀ VEMS+ și PD₂₀ VEMS-, neconcordant cu majoritatea datelor din literatură. Această discordanță ar putea admite ca explicație faptul că majoritatea subiecților incluși în lotul de validare a chestionarului provin din mediul industrial cu expuneri importante la agenți iritativi care acționează prin mecanismul inflamației neurogene și nu al celei alergice. Pe de altă parte nu au fost incluși în studiu subiecți astmatici care, în majoritatea lor sunt afectați prin mecanismul inflamației alergice.

Nici studiul relațiilor calitative (statutul de fumător/nefumător), nici cantitative (valoarea PD₂₀ VEMS necesară pentru obținerea unui test pozitiv) nu au dovedit o asociere între obiceiul de a fuma și pozitivitatea testului. Mai mult, din analiza situației pentru ex-fumători a rezultat că abandonarea fumatului nu a ameliorat semnificativ prevalența HRB. Pentru unii autori fumatul este cu probabilitate într-o relație de cauzalitate cu HRB^{11,18,26,30,97}, dar unele opinii îi rezervă un rol surprinzător mai puțin important decât starea atopică^{98,99}.

Valoarea diagnostică a diferitelor simptome respiratorii, culese cu ocazia anamnezei sau prin administrarea de chestionare este diferită, dar asocierea lor la același subiect crește probabilitatea existenței HRB. În studiul nostru, cel mai frecvent dintre simptome a fost respirația șuierătoare care, în cadrul grupului PD₂₀ VEMS+, are o valoare predictivă pozitivă de 95%, în timp ce valoarea predictivă negativă este de 85%. Astfel, absența fenomenului de wheezing face puțin probabilă prezența HRB. Acest simptom, după cum a rezultat din calculul statistic are o specificitate superioară nivelului de sensibilitate. O asociere puternică între respirația șuierătoare în ultimele 12 luni și HRB au observat-o și alți autori^{13,26,101,102}, încât prezența acestui simptom pare să fie acceptată în general ca sugestivă pentru HRB, respectiv pentru astm. În seria noastră de observații, asocierea între wheezing și senzația de respirație greoaie concomitentă s-a constatat exclusiv la pacienții confirmați ca hiperreactivi cu testul PD₂₀ VEMS. Un alt simptom important pentru diagnostic este constricția toracică resimțită ca o senzație de presiune matinală. 62 din 65 pacienți care au declarat prezența acestui simptom au prezentat HRB la testul cu histamină, având o valoare predictivă pozitivă de 95% și o valoare predictivă negativă de 92%. Specificitatea acestui simptom este mare, dar sensibilitatea este mică, senzația de constricție toracică fiind prezentă doar la 26% dintre subiecți.

Dispneea de repaus sub formă de criză, deși semnificativă statistic la comparația frecvenței sale cu statusul de HRB s-a constatat mai des în grupul PD₂₀ VEMS-, fiind mai degrabă în relație cu prezența bronșitei cronice. Prevalența acestui simptom are o încărcare subiectivă deosebită în sensul că percepția fenomenului dispnee diferă mult de la un subiect la altul. În alte studii ea figurează ca o manifestare frecventă^{85,103,104} în altele, cum este studiul lui Trigg²⁶, nici tusea, nici dispneea nu s-au corelat cu HRB.

Dispneea instalată brusc după un efort fizic intens a fost unul dintre simptomele frecvente, cu o valoare predictivă pozitivă de 89% și una negativă de 70%. Acest simptom, cunoscut de mai multă vreme ca HRB de efort, a sugerat și utilizarea efortului fizic drept agent de declanșare a obstrucției bronșice în arsenalul de investigare a HRB. Respectivul fenomen este perceput în mod diferit de către intervievați, motiv care stă la baza valorii sale predictive mai puțin performantă comparativ cu respirația șuierătoare. Asociat cu aceasta, valoarea diagnostică marchează o creștere importantă.

Nu s-au constatat aspecte semnificative cu privire la prevalența tusei, fie ca atac nocturn, fie ca manifestare matinală în timpul iernii. Acest fapt este dificil de explicat deoarece HRB se poate manifesta clinic și funcțional după respirația de aer rece. Prevalența tusei ca atac nocturn a fost doar ușor superioară în grupul cu HRB față de normoreactivi, în timp ce tusea matinală, relativ frecventă (26% pe lotul întreg) a

fost sensibil egală ca prevalență în loturile cu și fără HRB. Pentru unii autori tusea, survenind mai ales sub formă de atacuri, poate sugera HRB^{47,103,104} pentru alții nu²⁶.

În cazurile în care simptomele au conturat criteriile diagnostice pentru bronșită cronică, răspunsurile pozitive la testarea cu histamină au avut o prevalență identică și permit precizarea faptului că HRB are șanse egale de a fi pozitivă sau negativă la subiecții cu bronșită cronică.

În concordanță cu observațiile noastre, cele mai valoroase simptome clinice care sugerează prezența HRB s-au dovedit a fi respirația șuierătoare înafara episoadelor infecțioase, senzația de constricție toracică matinală și dispneea instalată brusc după terminarea unui efort fizic intens. Valoarea predictivă pozitivă pentru HRB crește în condițiile asocierii acestor simptome, când atinge 100%.

În ansamblul său, chestionarul ECRHS II apare ca un instrument util și eficient pentru detectarea HRB, fiind validat de confirmarea acestui sindrom prin testarea inhalatorie farmacologică.

Studiul II. Hiperreactivitatea bronșică și declinul funcției ventilatorii la muncitorii dintr-o turnătorie.

Scopul și obiectivele studiului

În studiul anterior, de validare a chestionarului ECRHS II, am constatat că unele simptome respiratorii, precum wheezing, senzația matinală de constricție toracică și dispneea instalată brusc după terminarea unui efort intens, epuizant sunt înalt predictive pentru HRB. În cel de-al doilea studiu ne propunem ca și obiective evaluarea pe bază de chestionar a prevalenței HRB, relațiile dintre aceasta și rata declinului funcțional și aprecierea unor eventuale relații între prezența HRB și intensitatea expunerii la risc, luând în considerare expunerea cumulativă la pulberi minerale.

Scopul acestui studiu constă în stabilirea unor criterii practice și ușor aplicabile de constituire a unui grup țintă asupra căruia trebuie acționat prin mijloace multiple preventive în vederea conservării funcției ventilatorii.

Material și metodă

Lotul cercetat a fost constituit randomizat din angajații secțiilor de turnătorie și prelucrare ale unei întreprinderi producătoare de armături metalice. Din efectivul de angajați ai celor două secții și-au exprimat acordul de participare la studiu, completând chestionarul de simptome, 105 angajați.

Criteriile de includere în lotul de cercetare au fost acordul de parcurgere și de răspuns la chestionarul administrat și o activitate în una din cele două secții de cel puțin 12 luni, condiție necesară pentru a putea calcula rata medie de declin a VEMS.

Criteriile de excludere au fost prezența hipertensiunii arteriale, a cardiopatiei ischemice și o cooperare dubioasă la explorarea funcției ventilatorii, tradusă prin diferențe mai mari de 20-30 ml între cele trei probe executate cu ocazia investigării.

Evaluarea expunerii la risc s-a făcut prin determinări ale agenților poluanți din aer la locurile de muncă iar intensitatea expunerii s-a apreciat pentru fiecare angajat, calculându-se expunerea cumulativă (EC) la pulberi ca produs al concentrației de pulberi cu numărul de ani lucrați, acest indicator fiind exprimat în „ani de praf” (dust years). Pentru angajații care au avut mai multe locuri de muncă, EC s-a calculat ca sumă a produselor pentru fiecare din aceste locuri. Determinările de mediu s-au făcut la Institutul de Sănătate Publică din Cluj-Napoca prin metode specifice pentru fiecare noxă în parte (metale: Pb, Cu, Zn; formaldehida; fenoli și crezoli; solvenți organici; oxizi de azot, ozon și dioxid de sulf; pulberi totale). Deoarece determinările de metale și solvenți organici au evidențiat concentrații situate cu mult

sub limita admisă sau chiar sub limita de detectare, au fost reținute ca factori etiologici doar pulberile mixte exprimate în mg/mc, diferite de la un loc de muncă la altul, ele servind la calcularea EC.

Aplicarea chestionarului ECRHS II a vizat 105 subiecți și s-au parcurs 30 itemi și derivați. Dintre acești itemi, 20 sunt pentru simptome de bază: Q1-Q20, din care Q14-Q20 se referă la simptome în relație cu afecțiuni respiratorii și cutanate sugestive pentru stare alergică. Hiperreactivitatea bronșică s-a considerat ca prezentă cu probabilitate la subiecții care au răspuns „da” la itemii Q1 (wheezing), Q2 (senzația matinală de constricție toracică) și Q4 (dispnee instalată brusc după un efort epuizant). Selectarea acestor simptome s-a făcut pe baza observațiilor din primul studiu, de validare a chestionarului ECRHS II, cu care ocazie am stabilit valoarea predictivă pozitivă înaltă a acestor simptome pentru HRB. Itemii Q28, Q28.1-4 și Q29 au furnizat relații cu privire la locul de muncă, vechimea activității profesionale în acest loc și eventualele simptome ca wheezing, senzația de constricție toracică și posibilele refugii de la locul de muncă datorate apariției unor simptome respiratorii, iar itemii Q45, Q46, Q55, Q61 – Q63 au testat prezența la domiciliu a unor condiții de sensibilizare alergică (mucegaiuri, carpete vechi, animale de companie). Relațiile asupra fumatului s-au obținut din răspunsurile la itemii Q74, Q74.1, Q74.2.1, 74.3, 74.3.2.1 și Q75.1, atât calitativ (fumător/nefumător) cât și cantitativ (indicele de fumat), sau fumatul pasiv. Indicele de fumat s-a calculat ca produs între numărul de țigări fumate pe zi cu numărul anilor de fumat, raportat la 20.

Testarea funcției ventilatorii. La fiecare subiect s-au efectuat trei testări reținându-se pentru studiu valorile performante ca valori absolute și ca valori procentuale. Am avut la dispoziție date funcționale din ultimii 6 ani obținute în aceleași condiții și cu același aparat. S-au considerat ca obstructivi cronici subiecții cu VEMS sub 80% din valoarea de predicție și cu un raport VEMS/CV mai mic de 0,7^{32,76} iar ca bronșitici cronici, cei care au răspuns cu „da” la itemii Q8.1 și Q10.1 (tuse cronică cu expectorație timp de cel puțin 3 luni succesive pe an în doi ani consecutivi). Timpul mediu de observație a fost de 44,88 și a variat între 12 și 84 de luni. Calcularea ratei medii anuale de declin a VEMS ($\Delta VEMS$) s-a făcut după formula: $(VEMS_1 - VEMS_2) \times 12 / \text{interval de observație în luni}$ și s-a exprimat în ml/an ($VEMS_1$ = valoarea absolută de la introducerea în lot, $VEMS_2$ = valoarea absolută la sfârșitul perioadei de observație). Media valorilor $\Delta VEMS$ obținute la întregul lot a fost comparată cu cea a unui lot de control, incluzând 34 subiecți sănătoși, de vârstă apropiată cu cea a subiecților incluși în studiu.

Radiografia pulmonară standard. Deoarece pulberile mixte conțin inclusiv silice liberă, am efectuat la fiecare subiect radiografia pulmonară standard pentru a exclude condiționarea eventualelor simptome respiratorii de prezența unei silicoze.

Principiul și tehnica prelucrării statistice a datelor culese este cea menționată în studiul I.

Rezultate și discuții

Cercetarea tulburărilor funcționale respiratorii în relație cu simptomele la muncitorii dintr-o turnătorie s-a derulat pe coordonatele chestionarului ECRHS II, validat în primul studiu ca instrument de depistare a HRB. În studiul nostru factorii de risc asupra aparatului respirator sunt numeroși, principalii agenți nocivi fiind pulberile mixte conținând dioxid de siliciu, implicând efecte iritative care pot genera inflamație de tip neurogen.

În lotul cercetat proporția femeilor a fost semnificativ mai mică comparativ cu cea a bărbaților, oglindind specificul activității în acest domeniu cu muncă fizică grea, diferențele fiind expresia opțiunii forței de muncă pentru asemenea activități profesionale.

Raportat la valoarea predictivă pozitivă, observată în primul studiu, frecvența cazurilor în care a fost prezent un singur simptom, două sau trei simptome asociate, conturând astfel o HRB probabilă, este de 38%, puțin superioară altor studii bazate pe loturi constituite aleator^{13,14,15}, fără a include subiecți cunoscuți ca astmatici sau suferind de BPCO. Cel mai frecvent dintre simptomele semnalate în contextul HRB a fost respirația șuierătoare confirmată și în alte studii¹¹². Asocierea cu alte simptome respiratorii, precum în studiul nostru, senzația de apăsare toracică și dispneea survenită brusc după terminarea unui efort, cresc valoarea predictivă pentru HRB.

Chestionarul ECRHS II include și criteriile de bază pentru diagnosticul bronșitei cronice și al BPCO. Prevalența acestora observată de noi se situează în contextul datelor cunoscute din literatură^{113,114}. Bronșita cronică s-a observat la 14%, iar BPCO la 8% din efectivul studiat. Faptul că prezența simptomelor sugestive pentru HRB a înregistrat o prevalență superioară la subiecții cu bronșită cronică și BPCO, comparativ cu cea a subiecților indemni de aceste afecțiuni, confirmă asocierea frecventă a hiperreactivității bronșice cu bronșita cronică și cu BPCO.

Faptul că diferențele de prevalență au fost ne semnificative la comparația dintre fumători și nefumători, atrage atenția asupra existenței unei poluări intense a mediului de muncă, condiție care „șterge” diferențele atribuibile statutului de fumător. Dacă prevalențele pentru bronșita cronică, BPCO și boala căilor aeriene mici nu s-au situat într-o relație de cauzalitate cu obiceiul de a fuma și cu starea atopică, expunerea cumulativă la pulberi a apărut ca o condiție etiologică remarcabilă pentru BPCO și obstrucția căilor aeriene periferice. Și aici se confirmă faptul că expunerile ocupaționale la concentrații înalte de pulberi anulează diferențele de prevalență bazate pe alte criterii, cum sunt starea atopică și obiceiul de a fuma.

Declinul funcțional constat de noi este mult superior celui fiziologic, apropiindu-se de cel comunicat de Bakke și colab.⁷⁶ la muncitorii din subteran care efectuează operațiuni de perforare pentru construcții de tunele. În studiul nostru, Δ VEMS a fost de 29 ml/an la lotul de control și 27,7 ml/an la subiecții din lotul de cercetat care nu au prezentat simptome respiratorii. Datele noastre susțin faptul că expunerea cumulativă la pulberi este cel mai important factor de risc pentru limitarea fluxului de aer prin creșterea ratei de declin a VEMS și pentru prezența simptomelor respiratorii. În lotul studiat de noi Δ VEMS nu s-a corelat semnificativ cu statutul de fumător, aspect explicabil probabil, tot prin nivelul înalt de poluare. Cercetarea acestor relații a confirmat și prin metoda scorului de simptome că media acestuia a fost semnificativ mai mare la subiecții cu Δ VEMS patologic. Analiza declinului VEMS în funcție de statutul de fumător/nefumător nu a evidențiat diferențe semnificative statistic după acest criteriu. În raport cu expunerea cumulativă la praf și statutul de fumător/nefumător, declinul VEMS a realizat un model liniar semnificativ de relații, constatare în acord cu rezultatele altor studii care au demonstrat că rata Δ VEMS, la fumători, excede pe cea observată la nefumători, cu mici diferențe de la un autor la altul, între 7 și 12,6 ml/an^{32,33,70}.

Prevalența obstrucției în căile aeriene mici a variat în studiul nostru, pentru principalele simptome respiratorii între 79,4% și 90,9%, subiecții asimptomatici având în marea lor majoritate valori normale. În contextul expunerii la pulberi silicogene, cum este cazul lotului studiat de noi, în sectorul mineritului aurifer, obstrucția căilor aeriene mici s-a dovedit dependentă de gravitatea silicozei⁸³. În lotul studiat de noi nu au fost confirmate cazuri de silicoză. Acest fapt prezintă importanță deosebită deoarece semnificația obstrucției pe căile aeriene mici în silicoză este alta, și anume, prezența leziunilor de fibroză la nivelul căilor aeriene mici⁸².

Ambii parametrii ventilatori cercetați, Δ VEMS și MEF₅₀ nu s-au dovedit influențați de starea atopică, așa cum susțin numeroase date din literatură. Dar, subiecții vizați în cercetarea noastră au dovedit, cu probabilitate HRB și consecutiv acesteia o rată crescută a declinului funcțional, cu obstrucție pe căile aeriene mici în condițiile inflamației nonalergice a căilor aeriene și nu în prezența stării atopice, condiție la care se referă majoritatea publicațiilor din acest domeniu. În favoarea acestei opinii aducem observațiile noastre care au evidențiat diferențe ne semnificative între subiecții atopici și nonatopici considerați ca afectați de HRB.

Concluzii generale

1. Având ca scop aplicarea unui chestionar pentru detectarea simptomelor sugestive de HRB la un grup de muncitori dintr-o turnătorie cu un efectiv de 105 subiecți, s-a realizat în prealabil un studiu de

validare a chestionarului ECRHS II, punând față în față simptomele înregistrate în fiecare caz cu testul farmacologic cu histamină, exprimat ca PD₂₀ VEMS, pe un lot de 278 subiecți nonastmatici cu simptome respiratorii.

2. Chestionarul ECRHS II s-a dovedit un instrument eficient de lucru, confirmarea cazurilor cu HRB fiind semnificativă în condițiile existenței simptomelor respiratorii. Cele mai frecvente simptome au fost fenomenul de wheezing înafara infecțiilor respiratorii recurente, senzația matinală de apăsare toracică și dispneea instalată după terminarea unui efort fizic intens. Valoarea predictivă a simptomelor respiratorii crește pe măsura asocierii acestora, atingând 100% în cazurile care prezintă toate cele trei simptome.

3. Pe baza validării chestionarului ECRHS II am constatat o prevalență a HRB ca probabilă în 38% din efectivul unei turnătorii, în condițiile expunerii ocupaționale la iritanți respiratori, în primul rând, la pulberi mixte conținând inclusiv silice liberă.

4. Din ambele studii a rezultat că fumatul nu a influențat prevalența simptomelor respiratorii. În cadrul studiului de validare am interpretat acest fenomen ca rezultat al faptului că subiecții care au apelat la serviciul Clinicii de Medicina Muncii sunt activi profesional în medii poluate cu iritanți respiratori, adesea necontrolate, iar în al doilea studiu, concentrațiile mari de pulberi „sting” diferențele de prevalență între fumători și nefumători, aspect bine cunoscut în literatura de specialitate.

5. Atopicii au prezentat o prevalență semnificativ mai mare, în comparație cu nonatopicii, a simptomelor sugestive de HRB, dar nu au prezentat frecvențe mai mari ale declinului funcțional.

6. Bronșita cronică, cu o prevalență de 14,2% și BPCO cu o prevalență de 7,6% s-au asociat cu simptome respiratorii care au sugerat faptul că ambele afecțiuni presupun frecvent existența hiperreactivității căilor aeriene.

7. Cel mai influent factor etiologic s-a dovedit a fi expunerea cumulativă la pulberi. Aceasta s-a aflat în relație cu simptomele respiratorii, crescând în paralel cu scorul acestora și s-a implicat în rata crescută a declinului funcțional (Δ VEMS) și în obstrucția căilor aeriene mici.

8. Din ambele studii rezultă o valoare incontestabilă a investigării simptomelor de HRB pe bază de chestionar în vederea selecționării unor grupuri țintă pentru aplicarea unor măsuri generale și speciale menite să contribuie la conservarea funcției ventilatorii.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Boala pulmonară cronică obstructivă, afecțiune cu prevalență în creștere continuă, cu cost social ridicat, a incitat în ultima vreme o serie de studii care au contribuit la o mai bună cunoaștere a acesteia, mai ales în ce privește fazele inițiale de instalare. Se conturează tot mai mult faptul că, premergător scăderii parametrilor ventilatori, ar exista o hiperreactivitate bronșică, dar acest fapt necesită încă cercetări. Cu caracter confirmativ, studiul nostru aduce o contribuție importantă în sensul că hiperreactivitatea căilor aeriene este un fenomen premergător declinului funcțional.

Din motive multiple, între care costul investigației, timpul afectat determinărilor farmacologice etc., se recomandă utilizarea chestionarului de simptome respiratorii, în mod deosebit când ne adresăm efectivilor mai mari de persoane expuse la risc. Deoarece chestionarele sunt multiple și diferite în anumite privințe se recomandă studii de validare care să compare simptomele constatate pe această bază cu cele obținute prin testare (PD₂₀ sau PC₂₀). Lucrarea de față răspunde acestor recomandări prezentându-se ca un studiu de validare între puținele efectuate pe plan internațional și primul studiu de acest gen din România.

Dovedindu-se o metodă eficientă de identificare a subiecților cu HRB probabilă, care permite constituirea de grupuri țintă destinate măsurilor speciale de conservare a funcției ventilatorii, chestionarul ECRHS II este un excelent instrument destinat acestui scop. Rezultatele acestui studiu îl recomandă a fi aplicat în mod obligatoriu alături de calcularea ratei declinului funcțional. Astfel, acest

studiu și-ar aduce o contribuție importantă la îmbunătățirea metodologiei de monitorizare funcțională a subiecților expuși factorilor ocupaționali de risc pentru afecțiuni bronhopulmonare cronice.

Referințe selective

2. Cocârlă A. Astmul bronșic profesional. În: Cocârlă A, Editor. *Medicina Ocupațională* vol. 1. Cluj-Napoca: Ed. Med. Universitară „Iuliu Hațieganu”, 2008; p. 706-760.
4. Ramsdell JW, Nachtwey FJ, Moser KM. Bronchial hyperreactivity in chronic obstructive bronchitis. *Am Rev Respir Dis.* 1982; 126:829-832.
5. Cockroft DW, Killian DN, Mellon JJ, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy.* 1977; 7:235-243.
6. Empey DW, Laitinen LA, Jacobs L et al. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper respiratory tract infection. *Am Rev Respir Dis.* 1976; 113:131-139.
7. Rhodes BJ, Weiller JM, Donnelly AL et al. Young asymptomatic nonatopic adults have a high prevalence of methacholine airway responsiveness regardless of smoking history. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133 (part 2): A176.
10. Antosova M, Strapkova A, Plevkova J. Bronchial hyperreactivity: pathogenesis and treatment options. *Open J Molec Integr Physiol.* 2011; 1:43-51.
11. Gerbase MW, Schindler C, Zellweger JP et al. Respiratory effects of environmental tobacco exposure are enhanced by bronchial hyperreactivity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174(10):1125-1131.
13. Woolcock AJ. Asthma. In: Murray JF, Nadel JA, Eds. *Textbook of Respiratory Medicine*, 2nd Edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994; p.1283.
14. Burney PGJ, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J.* 1994; 7:954-960.
15. Cockroft D, Murdock K, Berscheid B. Relationship between atopy and bronchial responsiveness to histamine in a random population. *Ann Allergy.* 1984; 53:26-29.
16. Davies R, Pepys J. Occupational asthma. In: Clark TJH, editor. *Asthma*. London: Ed. Chapman and Hall, 1977; p. 190.
18. Jogi R, Janson C, Boman G, Bjorksten B. Bronchial hyperresponsiveness in two populations with different prevalence of atopy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8(10):1180-1185.
26. Trigg CJ, Bennet JB, Tooley M et al. A general practice based survey of bronchial hyperresponsiveness and its relation to symptoms, sex, age, atopy and smoking. *Thorax.* 1990; 45:866-872.

27. Ernst P, Ghezzi H, Becklake MR. Risk factors for bronchial hyperresponsiveness in late childhood and early adolescence. *Eur Respir J*. 2002; 20:635-639.
28. Woolcock AJ. Asthma. In: Murray JF, Nadel JA, eds. *Textbook of Respiratory Medicine*, vol 2. Philadelphia: Ed. WB Saunders Comp, 1994; p. 1303-1304.
30. Chinn S, Jarvis DR, Luczynska CM, Ackermann-Liebrich U et al. An increase in bronchial responsiveness is associated with continuing or restarting smoking. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172(8):956-961.
31. Minov J, Karadzinska-Bislimovska J, Vasilevska K et al. Effects of passive smoking at work on respiratory symptoms, lung function and bronchial responsiveness in never-smoking office cleaning women. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2009; 63(3):327-334.
32. Mamuya SH, Bratveit M, Mwaiselage J, Moet BE. Variability of exposure and estimation of cumulative exposure in a manually operated coal mine. *Ann Occup Hyg*. 2006; 50(7):737-745.
33. Cowie RL, Mabena SK. Silicosis, chronic airflow limitation and chronic bronchitis in South African gold miners. *Am Rev Respir Dis*. 1991; 143:80-84.
34. Haber P, Tashkin DP, Simmons M et al. Effect of occupational exposures on decline of lung function in early chronic obstructive pulmonary disease. *J Occup Environ Med*. 2007; 49(10):1143-1148.
47. Frans A, van den Eeckhaut J. Cough as the sole manifestation of airway hyperreactivity. *JLO*. 1989; 103(7):680-682.
59. Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST. Airway remodelling in asthma and novel therapy. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2013; 31(1):3-10.
60. Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergology International*. 2007; 56:331-340.
61. Descalzi D, Folli C, Scordamaglia F et al. Importance of fibroblasts-myofibroblasts in asthma-induced airway remodeling. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2007; 1(3):237-41.
65. Guenard H, Ronatbi S. Physiological aspects of the decline of pulmonary function with age. *Rev Mal Respir*. 2004; 21(5):13-24.
66. Quanjar PH, Tammeling GJ, Cotes JE. Standardized lung function testing. *Eur Respir J*. 1993; 10:1683-1693.
79. Xu X, Dockery DW, Ware JH et al. Effects of cigarette smoking on rate of loss of pulmonary function in adults: a longitudinal assessment. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146:1345-1348.
76. Bakke B, Ulvestad B, Stewart P, Eduard W. Cumulative exposure to dust and gases as determinants of lung function decline in tunnel construction workers. *Occup Environ Med*. 2004; 61(3):262-269.
82. Churg A, Wright JL. Small – airways lesions in patients exposed to nonasbestos mineral dusts. *Human Pathol*. 1983; 14:688-693.
83. Kozlov I, Cocâră A, Bocşa H. Small airways obstruction in silicosis. *Clujul Medical*. 2001; 74(3):327-336.

85. Riemersmaa R, Dirkje P, Kerstjens H et al. Development of a questionnaire for the assessment of bronchial hyperresponsiveness. *Primare Care Resp J*. 2009; 18(4):287-293.
97. Bergren DR. Environmental tobacco smoke exposure and airway hyperresponsiveness. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009; 8(5):340-7.
98. Steinman HA, Donson H, Kawalski M, Toerien A, Potter PC. Bronchial hyper-responsiveness and atopy in urban, peri-urban and rural South African children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2003; 14(5):383-93.
99. Sunyer J, Anto JM, Kogevinas M et al. Smoking and bronchial responsiveness in nonatopic and atopic young adults. Spanish Group of the European Study of Asthma. *Thorax*. 1997; 52(3):235–238.
101. Rijcken B, Scouten JP, Weiss ST et al. The relationship of non-specific bronchial hyperresponsiveness to respiratory symptoms in a random population sample. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 136:62-68.
102. Mortagy AK, Howell JB, Waters WE. Respiratory symptoms and bronchial reactivity: identification of a syndrome and its relation to asthma. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986; 293(6546):525-9.
103. Woolcock AJ, Peat JK, Salome CM et al. Prevalence of bronchial hyperresponsiveness and asthma in a rural adult population. *Thorax*. 1987; 42:361-368.
104. Sears MR, Jones DT, Holdaway MD et al. Prevalence of bronchial reactivity to inhaled methacholine in New Zealand children. *Thorax*; 1986, 41:283-289.
112. Petran M, Cocârlă A, Băiescu M. Association between bronchial hyper-reactivity and exposure to silicon carbide. *Occup Med (Lond)*. 2000; 50(2):103-6.
113. Cocârlă A, Olteanu A, Modorcea V. Surveillance of ventilation functions in collectives occupationally exposed to the risk of COPD. *Rev Ig Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol Pneumoftiziol Pneumoftiziol*. 1989; 38(4):353-8.
114. Mihălțan F, Ulmeanu R. Bronhopneumopatia cronică obstructivă. Ed. Orizonturi, București, 1966.

Summary of the PhD Thesis

Epidemiological and functional findings regarding the bronchial hyperresponsiveness in the industrial environment

PhD Student: **Andreea – Iulia Socaciu**

PhD Scientific Coordinator: **Prof. Dr. Aristotel Cocârlă**

Cluj-Napoca, 2013

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Definition and classification of bronchial hyperreactivity	17
2. Prevalence of bronchial hyperreactivity	19
3. Etiology of bronchial hyperreactivity	21
4. Pathogenesis of bronchial hyperreactivity (Airway inflammation)	25
5. Diagnosis of bronchial hyperreactivity	33
6. Consequences of airway inflammation	35
6.1 Airway remodeling	35
6.2 Ventilatory function decline	37
6.3 Airway obstruction	39
7. Questionnaires of respiratory symptoms in the epidemiological studies of the bronchial hyperreactivity	41
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/objectives (general and specific)	47
2. Methodology	49
3. Study I. The validation of the ECRHS II respiratory symptoms questionnaire	51
3.1. Introduction	51
3.2. Working hypothesis	51

3.3. Materials and methods	51
3.4. Results	53
3.5. Discussions	67
3.6. Conclusions	71
4. Study II. Bronchial hyperreactivity and the functional ventilatory decline in workers from a foundry	73
4.1. Introduction	73
4.2. Working hypothesis	73
4.3. Materials și methods	73
4.4. Results	78
4.5. Discussions	96
4.6. Conclusions	101
5. General Discussions	103
6. General Conclusions	109
7. Originality and inovative contributions of the thesis	111
REFERENCES	113
ABREVIATIONS	11

Keywords: bronchial hyperresponsiveness, ECRHS II respiratory symptoms questionnaire, FEV₁ decline, FEV₁ PD₂₀ histamine challenge test, cumulative exposure to dust.

Introduction

Publications in the field of pneumology in the last three decades have provided an ample space dedicated to the bronchial hyperresponsiveness (BHR). It is more and more obvious that from the etiopathogenetic point of view, non-specific lung diseases have as common functional element an increased bronchial reactivity. BHR, often acquired in early childhood, with or without clinical symptoms can be validated frequently in the domain of asthma and chronic bronchitis. Knowing this pathological functional condition is particularly important as an element of anticipation for asthma and COPD, as it marks the onset of hygienic and medical measures that are expected to improve its progression to clinical entities.

Studies on the acquired BHR in the occupational environment are so far limited. There are important differences regarding the conditioning of BHR currently observed in the clinical practice and that from the industrial environment. Underlying both is the airway inflammation and its consequences: airway remodeling, airway obstruction and ventilatory function decline.

The existence of a large number of subjects with asymptomatic BHR implies major risk factors, which are: persistent airway remodeling, chronicization of the cellular infiltrate and collagen proliferation in bronchial walls, evolving in time to a chronic airway obstruction without being accompanied by clinical warnings. For these reasons, a clinical and functional monitoring of the people at risk in the industrial environment seems rational, searching the subjects destined to special programs for the preservation of the respiratory function throughout the assessment of functional decline and BHR.

Current state of knowledge

Definition, prevalence and etiology of bronchial hyperreactivity

BHR is defined as an abnormality of the airways which allows them to narrow excessively and rapidly subsequent to the action of nonspecific stimuli. Although the BHR is the essential feature of asthma, it is not specific to asthma and can be detected also in chronic airway obstruction⁴, chronic rhinitis⁵, superior respiratory tract infections⁶, in the gastro-esophageal reflux and even in asymptomatic individuals with a normal respiratory function⁷.

Data on the prevalence of BHR are different from one author to another depending on the studied population. On different study groups, BHR is estimated between 10% and 25%^{13,14,15}, prevalences that are higher than those known for asthma, less than 5% in the general population¹⁶.

BHR, as an expression of bronchial motility disorder, is based on airway inflammation and involves the participation of endogenous factors (predisposing) and exogenous factors (determinants).

Among endogenous factors, the most important are of genetic nature. The main gained endogenous factor is derived from repetitive respiratory tract infections. Other endogenous factors are age, a wide open field for research, and gender, the aim of contradictory studies^{26,27}. Among the endogenous factors, the atopic status has a primary role in the development of BHR. Population studies have revealed that 85% to 90% of adults and children known as asthmatics had an atopic status associated with severe BHR²⁸.

Exogenous factors are of many and different origins: recurrent respiratory tract infections, exposure to irritants and sensitizers of domestic, occupational or environmental nature, micro and macroclimate, social and economic conditions, education and cultural level, intense exercise etc. A special place is held by the active and passive smoking^{11,30,31,32,33,34}.

Pathogenesis of bronchial hyperreactivity

The BHR substrate is the airway inflammation consisting of an increase in the number of activated cells in the mucosa and bronchial lumen. The inflammatory infiltrate remains in a chronic form and is "refreshed" by the contact with agents who have caused it.

Depending on the agent (agents) causing airway inflammation, which may be infectious, allergic or neurogenic. Allergic inflammation first involves a process of sensitization to allergens and a type I immune response to a new contact with them, after which the airway inflammation will perpetuate. Neurogenic inflammation is the consequence of exposure to respiratory irritants, generally low molecular weight substances, and is mainly directed by the nonadrenergic noncholinergic system (NANC), associated in some cases with a process of cholinergic neuromodulation. The infectious inflammation is in most cases a temporary state, leading to a transitory BHR. Regardless of the mechanism of inflammation, in the end an activated cell infiltrate is formed, with secretory and proliferative attributes, establishing the BHR.

Diagnosis of bronchial hyperreactivity

The "gold standard" for the diagnosis of BHR is the non-specific inhalatory challenge test (used extensively) using various agents: pharmacological (histamine, methacholine), hypertonic aerosols, inhalation of cold/dry air, exercise, isocapnic hyperventilation etc. The positive results do not confirm the existence of asthma. They confirm the presence of BHR but represent only one of the evaluation criteria for asthma.

The consequences of airway inflammation

Evaluation of the inflammatory process enjoys great interest, both for the diagnosis and for the follow-up of the affected subject, and can be established as an effectiveness criteria for the applied treatment. The presence of the inflammatory process in the airways causes three types of pathological phenomena, intimately linked. The first is the BHR, the second is the airway remodeling (AR) as a substrate for the bronchial hyperactivity and the third is the airway obstruction, that is consecutive to a high rate of functional decline.

AR is a dynamic process initiated by inflammation, with structural changes of the bronchial walls consisting of thickening, epithelial injuries, hyperplasia and hypertrophy of the smooth muscle cells, fibroblasts and calciform cell proliferation, associated with angiogenesis^{59,60,61}.

Knowing the annual rate of decline in FEV₁ (Δ FEV₁) is an easy and highly useful practice. This ventilatory parameter, FEV₁, physiologically evolves with age, so that after the age of 30 gradually decreases⁶⁵ at an annual rate established at 25ml/year⁶⁶, depending on individual, genetic factors, age, smoking habit, occupational and environmental exposure to allergens and irritants.

Respiratory symptoms questionnaires in the study of airway hyperresponsiveness

So far, for the assessment of BHR, were applied either respiratory symptoms questionnaires, in their original form or modified, or author's own design questionnaires. Regardless of the questionnaire, the diagnosis is established by its validation either in the context of asthma, or by confrontation with pharmacological tests.

Study I. Validation of the ECRHS II questionnaire for respiratory symptoms

Study purpose and objectives

The main objective of this study is the validation of the ECRHS II questionnaire recommended by the European Union, facing symptoms collected with data from the same subjects submitted to a inhaled histamine challenge testing (PD₂₀ FEV₁). The ultimate goal of this study is to give an answer to the question, whether the questionnaire can be considered as satisfactory for the study of BHR in some communities of the industry.

In the validation study for the ECRHS II questionnaire, 278 subjects were selected, 194 women and 83 men, who were admitted at the Occupational Medicine Clinic of Cluj-Napoca, between 2007-2010 for the evaluation of respiratory symptoms. The group was selected based on the following criteria: presence of respiratory symptoms for which patients have not been investigated in other medical services and the absence of an asthma diagnosis previous to admission into the clinic.

The exclusion criteria were: the presence of arterial hypertension, of ischemic heart disease, of a FEV₁ value less than 70% of the prediction value at the base ventilatory function testing, the existence of pneumoconiosis and the presence in the last 4 weeks of upper respiratory tract infections. Subjects who gave a positive response to item Q14 (Have you ever had asthma?) were not included in the study group.

Material and methods

The ECRHS II questionnaire was applied by going through items Q1 (Q1, Q1.1, Q1.2), Q2-Q7, Q8 (Q8, Q8.1), Q9, Q10 (Q10, Q10.1), Q11, Q12 (Q12, Q12.1, Q12.1.1), Q13, Q14 to Q74 for the respiratory symptoms and items (Q74, Q74.1, Q74.2.1, Q74.3, Q74.3.2.1) and Q75.1 to assess the smoking status. All subjects were clinically examined, had their blood pressure measured, an electrocardiogram, standard chest radiography and ventilatory function testing performed, investigations that were used to establish the studied group.

The histamine inhalatory challenge test was performed by the PD₂₀ FEV₁ method that quantifies the dose of histamine required to a standard 20% decrease in FEV₁ of the pre-test value.

The test began with the determination of base ventilatory parameters followed by the aerosol administration through a dosimeter, using a phosphate buffer, and then by a new determination of the parameters in the forced expirogram. If the administration of the phosphate buffer did not lead to a decrease in FEV₁ larger than 8-10% we proceeded to the administration of the histamine aerosol, considering that relative for the presence of BHR are FEV₁ PD₂₀ values less than 7.8 mole.

Evaluation of atopic status: identification of atopic patients was performed by prick skin tests to usual pneumoallergens. Interpretation of tests was carried out taking into account the reactivity of the skin to control markers, negative (serum phenol) and positive (histamine 1%). Drops of allergen were applied on the anterior side of the forearm at least 3 cm away from each other and strictly through each drop was performed a stick to the skin with a prick lancet. The test was considered positive when 15 minutes after application there was a papula at least 3 mm in diameter, usually accompanied by erythema and pruritus at one or more allergens.

Smoking habit was recorded both in terms of quality and quantity, an index of smoking was calculated by the formula "number of cigarettes smoked per day x number of years of smoking / 20".

Statistical tests were applied to a 5% significance level and data processing was performed with SPSS v16 and graphics were drawn with Microsoft Excel.

Results and Discussion

Patients included in the questionnaire validation group are middle-aged adults, with insignificant differences according to inhaled histamine testing results. In our series of observations, BHR was found with a frequency more than double in women compared to men, similar to other studies^{10,26}.

Regarding the relationship between BHR and the atopic status, our study found an almost equal proportion of atopic subjects in both groups tested to inhaled histamine: PD₂₀ FEV₁ + and PD₂₀ FEV₁ -, inconsistent with most of the literature data. This discrepancy could accept the explanation that most subjects included in the group for the questionnaire validation come from the industrial environment with significant exposure to irritative agents that act through the mechanism of neurogenic and not allergic inflammation. On the other hand, in the study were not included subjects with asthma who are mostly affected by the mechanisms of allergic inflammation.

Neither the study of qualitative relations (smoker/nonsmoker status), nor of the quantitative ones (PD₂₀ FEV₁ value necessary to obtain a positive test) did not show an association between smoking habits and the test positivity. Furthermore, the analysis of the ex-smokers showed that smoking cessation did not improve significantly the prevalence of BHR. For some authors smoking is likely in a causal relationship with BHR^{11,18,26,30,97}, but some surprising opinions reserve for it a less important role than for the atopic status^{98,99}.

The diagnostic value of various respiratory symptoms collected during history taking or by administering questionnaires is different, but their association in the same subject increases the likelihood of BHR. In our study, the most common symptom was wheezing, that within the PD₂₀ FEV₁ + group had a positive predictive value of 95%, while the negative predictive value was 85%. The lack of wheezing makes BHR unlikely. This symptom, as a result of statistical calculation has a higher specificity than sensitivity. A strong association between wheezing in the last 12 months and BHR was also noticed by other authors^{13,26,101,102}, so that the presence of this symptom seems to be generally accepted as suggestive for BHR, respectively for asthma. In our series of observations, the association between wheezing and shortness of breath was found exclusively in patients with BHR confirmed by the PD₂₀ FEV₁ test. Another important diagnostic symptom is chest tightness, felt as morning tightness. 62 of 65 patients who reported these symptoms presented BHR at histamine challenge testing with a positive predictive value of 95% and a negative predictive value of 92%. The specificity of this symptom is high, but the sensitivity is low, chest tightness being present only in 26% of subjects.

Dyspnea at rest in crisis, although statistically significant, comparing its frequency with BHR status, was more often found in the PD₂₀ FEV₁ - group, in an important relation with the presence of chronic bronchitis. The prevalence of this symptom is subjective because the perception of dyspnea varies greatly from one subject to another. In some studies it appears as a frequent manifestation^{85,103,104}, while in others, such as the study of Trigg²⁶, neither cough, nor shortness of breath were correlated with the BHR.

Sudden dyspnea after an intense workout was one of the common symptoms, with a positive predictive value of 89% and a negative one of 70%. This symptom, known for some time as effort BHR, suggested the use of exercise as a release agent for the bronchial obstruction in the investigation of BHR. That phenomenon is perceived differently by interviewees, reason behind its predictive value being less efficient than that of wheezing. Associated with this, the diagnostic value marks a significant growth.

No significant issues were found on the prevalence of cough, whether nocturnal attacks or morning manifestations in winter. This is difficult to explain because BHR may manifest clinically and functionally after cold air breathing. The prevalence of nocturnal cough attacks was only slightly superior in the BHR group in comparison with the unreactive group, while the morning cough, relatively common (26% of the whole group), had substantially the same prevalence in groups with and without BHR. For some authors, the cough, occurring mostly in form of attacks, may suggest a BHR⁴⁷, for others no^{26,103,104}.

In cases where symptoms have outlined the diagnostic criteria for chronic bronchitis, positive responses, when tested with histamine, had an identical prevalence, which permits specifying that BHR has an equal chance of being positive or negative in subjects with chronic bronchitis.

According to our observations, the most valuable clinical symptoms suggestive of BHR have proven to be wheezing outside infectious episodes, chest tightness and morning sudden shortness of breath after a strenuous physical effort. The positive predictive value for the BHR increases, reaching 100%, when these three symptoms are associated.

The ECRHS II questionnaire appears as a useful and efficient tool for detecting BHR, being validated by the confirmation of this syndrome by inhaled pharmacological testing.

Study II. Bronchial hyperreactivity and ventilatory function decline in workers from a foundry.

Study purpose and objectives

In the previous study, validation of ECRHS II questionnaire, we found that some respiratory symptoms such as wheezing, chest tightness and morning sudden shortness of breath after an intense, exhausting effort are highly predictive of BHR. In the second study we aim a questionnaire-based assessment of the BHR prevalence, relations between it and the rate of functional decline and an assessment of relations between BHR presence and the intensity of exposure, taking into account the cumulative exposure to mineral dust.

The purpose of this study is to set practical and easily applicable criteria for establishing a target group on which preventive action should be taken by multiple means to preserve ventilatory function.

Materials and methods

The research group was randomized and consisted of employees from foundry and machining departments of a company producing rebar. From the total number of employees of the two departments, 105 have agreed to participate in the study by completing a questionnaire of symptoms.

Criteria for inclusion in the research group were the agreement by response to the questionnaire administered and an activity of at least 12 months in one of the two foundry sections, needed to calculate the average rate of decline in FEV₁.

Exclusion criteria were the presence of arterial hypertension, ischemic heart disease and the lack of cooperation when exploring ventilatory function, translated by differences larger than 20-30 ml between the three tests performed during the investigation.

Risk exposure assessment was made by measurements of air pollutants in workplaces and the intensity of exposure was assessed for each employee, calculating cumulative exposure to dust (CE) as the product of the concentration of dust particles to the number of years worked, this indicator being expressed as "dust years". For employees who have had several jobs, CE was calculated as the sum of products for each of these jobs. Environmental determinations were made at the Institute of Public Health Cluj-Napoca with specific methods for each contaminant in part (metals: Pb, Cu, Zn, formaldehyde, phenols and cresols, organic solvents, nitrogen oxides, ozone and carbon dioxide sulfur, total dusts). Since the determination of metals and organic solvents showed concentrations well below the permissible limit or even below the detection limit, only the mixed dusts measured in mg/m³, different from one job to another, were retained as etiologic factors being used in for the calculation of CE.

Application of the ECRHS II questionnaire targeted 105 subjects and was going through 30 items and their derivatives. Of these items, 20 are for the basic symptoms: Q1-Q20, while Q14-Q20 refer to symptoms related to respiratory and skin conditions, highly suggestive for an allergic disease. Bronchial hyperreactivity was considered as present with high probability in subjects who answered "yes" to items Q1 (wheezing), Q2 (morning chest tightness) and Q4 (sudden onset dyspnea after an exhausting effort). The selection of these symptoms was based on observations from the first study, the validation of the ECRHS II questionnaire, where we had found high positive predictive value of these symptoms for BHR. Items Q28, Q29 Q28.1-4 have provided information on the job, the duration of professional activity in the current place and any symptoms as wheezing, chest tightness or possible absence from work due to the occurrence of respiratory symptoms, while items Q45, Q46, Q55, Q61 - Q63 tested the presence of home sensitization allergic conditions (mold, old rugs, pets). Relations with smoking were obtained from responses to items Q74, Q74.1, Q74.2.1, 74.3, 74.3.2.1 and Q75.1, both qualitatively (smoker/nonsmoker) and quantitative (smoking index) or passive smoking. Smoke index was calculated as the product of the number of cigarettes smoked per day by the number of years of smoking, divided by 20.

Ventilatory function testing. For each subject three tests were carried out, retaining for our study the best values in absolute and percentage formats. We also had the available functional data obtained in the last 6

years in the same conditions and with the same testing device. We defined as chronic obstructive patients the subjects with FEV₁ values below 80% of the prediction value, associated with a VEMS/CV ratio of less than 0,7^{32,76} and as chronic bronchitis patients, those who answered "yes" to items Q8.1 and Q10 .1 (chronic cough with expectoration for at least 3 months a year in two consecutive years). The average observation time was 44.88 and varied between 12 to 84 months. Calculating the average annual rate of FEV₁ decline (Δ FEV₁) was made using the formula: $(FEV_{11} - FEV_{12}) \times 12 / \text{observation interval in months}$ and was expressed in ml/year (FEV₁₁ = absolute value at the introduction in the lot, FEV₁₂ = absolute value at the end of the observation period). The average Δ FEV₁ values obtained for the entire lot were compared with that of a control lot including 34 healthy subjects, similarly aged to the subjects included in the study.

Standard chest X-ray. Since mixed dusts contain also free silica, we performed for each subject a standard chest X-ray to rule out a potential silicosis.

The principles and technique of statistical analysis on the collected data are listed in study I.

Results and Discussion

The research of functional respiratory disorders in relation to the symptoms of some workers from a foundry ran along the lines of the ECRHS II questionnaire, validated in the first study as a screening instrument for BHR. In our study, the respiratory risk factors are numerous, the main harmful agents being mixed dusts containing silica, which can cause irritative effects involving a neurogenic inflammation.

In the investigated lot the proportion of women was significantly lower than that of men, reflecting the specifics of hard physical activity in this field, the differences being the expression of choice for such a labor.

In relation to the positive predictive value observed in the first study, the frequency of one symptom or two or three symptoms in association, thus outlining a probable BHR is 38%, a little higher than found in other studies based on randomly established lots^{13,14,15}, which excluded subjects known to suffer from COPD or asthma. The most frequently reported symptom in the context of BHR was wheezing, confirmed also in other studies¹¹². The association with other respiratory symptoms, such as the chest tightness or dyspnea occurred suddenly after an effort, increased the predictive value for BHR.

The ECRHS II questionnaire also includes the basic criteria for the diagnosis of chronic bronchitis and COPD. Their prevalence observed by us lies within the margins known in the literature data^{113,114}. Chronic bronchitis was observed in 14% and COPD in 8% of the entire study group. The fact that the presence of symptoms suggestive for BHR had a higher prevalence in subjects with chronic bronchitis and COPD compared to the subjects free from these diseases, confirms the frequent association of BHR with chronic bronchitis and COPD.

The fact that the differences in prevalence were not significant comparing smokers and nonsmokers, draws attention to the existence of an intense pollution of the working environment condition that "deletes" the differences attributable to the smoking status. Since the prevalence for chronic bronchitis, COPD and small airway disease was not in a causal relationship with the habit of smoking and atopic status, cumulative exposure to dust has emerged as a remarkable etiological condition for COPD and peripheral airway obstruction. Here too it is confirmed that the occupational exposure to high concentrations of dust cancels the differences in prevalence based on other criteria, such as atopic status and smoking habits.

Functional decline found by us is much higher than the physiological decline, approaching that communicated by Bakke and colab.⁷⁶ in the underground workers performing drilling operations for tunneling. In our study, Δ FEV₁ was 29 ml/year in the control group and 27,7 ml/year in subjects from the group who had no respiratory symptoms. Our data underlines the fact that cumulative exposure to dust is

the most important risk factor for airflow limitation by an increase in the rate of FEV₁ decline and for the presence of respiratory symptoms. In our study group, Δ FEV₁ was not significantly correlated with the smoking status, a fact probably also explained by the high level of pollution. Researching these relationships confirmed by means of symptom scores that the average score was significantly higher in subjects with pathological Δ FEV₁. FEV₁ decline analysis by smoking status did not reveal any statistically significant differences. In relation to cumulative exposure to dust and smoking status, FEV₁ decline has significantly followed a linear relationship model, a finding consistent with the results of other studies that have shown that the rate of Δ FEV₁ for smokers, exceeds that observed in non-smokers, with small differences from one author to another, between 7 and 12.6 ml/year^{32,33,70}.

The prevalence of lower airway obstruction in our study varied for the main respiratory symptoms between 79,4% and 90,9%, the majority of the asymptomatic subjects having normal values. In the context of occupational exposure to silica dusts, such as our study group, in the gold mining sector the small airway obstruction proved dependent on the severity of silicosis⁸³. In our study group there have not been any confirmed cases of silicosis. This is of special importance because the significance of the small airways obstruction in silicosis is different, namely, the presence of fibrotic lesions in the small airways⁸².

Both ventilatory parameters investigated, FEF₅₀ and Δ FEV₁, were not influenced by the atopic state as claimed by numerous studies in the literature. However, the subjects mentioned in our research have shown with high probability BHR and, consecutively, a high rate of functional decline with obstruction of the small airways, in cases with non-allergic airway inflammation and not in the presence of an atopic status, condition referred to by most publications in this field. In favor of this result we bring our observations that reveal insignificant differences between atopic and nonatopic subjects considered as affected by the BHR.

General conclusions

1. With the aim of applying a questionnaire to detect symptoms suggestive of BHR in a group of workers from a foundry with a total of 105 subjects, we first performed a validation study of the ECRHS II questionnaire, facing symptoms recorded in each case with histamine pharmacological tests, expressed as PD₂₀ FEV₁, on a group of 278 nonasthmatic subjects with respiratory symptoms.
2. The ECRHS II questionnaire was proven as an effective tool for the confirmation of BHR cases when there are significant respiratory symptoms. The most common symptoms were wheezing outside recurrent respiratory infections, morning chest tightness and dyspnea installed after a strenuous physical effort. The predictive value of respiratory symptoms increases as they associate, reaching 100% in the cases with all three symptoms.
3. Based on the validation of the ECRHS II questionnaire we found a probable prevalence of 38% in the BHR for the employees of a foundry, in the context of occupational exposure to respiratory irritants primarily at mixed dusts including also free silica.
4. Both studies showed that smoking did not influence the prevalence of respiratory symptoms. In the validation study we interpreted this as a consequence that the subjects investigated in the Occupational Medicine Clinic were professionally active in environments contaminated with often uncontrolled respiratory irritants, while in the second study, the high concentrations of dust "delete" the differences in prevalence between smokers and nonsmokers, an aspect well-known in the literature.
5. The atopic subjects had a significantly higher prevalence, in comparison to the nonatopic subjects with symptoms suggestive of BHR, but did not have higher rates of functional decline.

6. Chronic bronchitis with a prevalence of 14,2% and COPD with a prevalence of 7,6% were associated with respiratory symptoms, suggesting that both disorders often require the existence of airway hyperreactivity.

7. The most influential etiologic factor was found to be the cumulative exposure to dust. This was in relation to respiratory symptoms, increasing in parallel with their score, while being involved in the high rate of functional decline (ΔFEV_1) and in small airway obstruction.

8. Both studies show that investigating the symptoms of BHR based on a questionnaire is of undeniable value. The purpose is the selection of target groups in which to apply general and specific measures aimed for the preservation of the ventilatory function.

Originality and innovative contributions of the thesis

Chronic obstructive pulmonary disease, a condition with a steadily increasing prevalence and a high social cost, recently inspired a number of studies that have contributed to a better understanding, especially in the initial stages of the disease onset. It further outlines that, prior to the decrease of ventilatory parameters, there is a bronchial hyperreactivity involved, but more research is still required. Our study makes an important contribution showing that airway hyperreactivity is a phenomenon preceding the functional decline.

For multiple reasons, including the cost of the investigation, the needed time for the pharmacological tests etc., the use of respiratory symptoms questionnaire is recommended, especially when we target larger groups of people at risk. Since there are multiple and different questionnaires, validation studies are recommended for the comparison of the observed symptoms with the results obtained by functional testing (PD₂₀ or PC₂₀). This thesis faces these recommendations presenting itself as a validation study among the few conducted internationally and it is the first study of this kind in Romania.

The ECRHS II questionnaire is an excellent tool and is proved to be an effective method for identifying subjects with probable BHR, which allows setting target groups destined to special measures for the conservation of the ventilatory function. The results of this study recommend it to be applied along with the functional decline assessment. Thus, this study could make an important contribution, improving the methodology for functional monitoring of subjects exposed to occupational risk factors for chronic lung diseases.

Selective References

2. Cocârlă A. Astmul bronșic profesional. În: Cocârlă A, Editor. Medicina Ocupațională vol. 1. Cluj-Napoca: Ed. Med. Universitară „Iuliu Hațieganu”, 2008; p. 706-760.
4. Ramsdell JW, Nachtwey FJ, Moser KM. Bronchial hyperreactivity in chronic obstructive bronchitis. *Am Rev Respir Dis.* 1982; 126:829-832.
5. Cockroft DW, Killian DN, Mellon JJ, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy.* 1977; 7:235-243.

6. Empey DW, Laitinen LA, Jacobs L et al. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper respiratory tract infection. *Am Rev Respir Dis.* 1976; 113:131-139.
7. Rhodes BJ, Weiller JM, Donnelly AL et al. Young asymptomatic nonatopic adults have a high prevalence of methacholine airway responsiveness regardless of smoking history. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133 (part 2): A176.
10. Antosova M, Strapkova A, Plevkova J. Bronchial hyperreactivity: pathogenesis and treatment options. *Open J Molec Integr Physiol.* 2011; 1:43-51.
11. Gerbase MW, Schindler C, Zellweger JP et al. Respiratory effects of environmental tobacco exposure are enhanced by bronchial hyperreactivity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174(10):1125-1131.
13. Woolcock AJ. Asthma. In: Murray JF, Nadel JA, Eds. *Textbook of Respiratory Medicine*, 2nd. Edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994; p.1283.
14. Burney PGJ, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J.* 1994; 7:954–960.
15. Cockcroft D, Murdock K, Berscheid B. Relationship between atopy and bronchial responsiveness to histamine in a random population. *Ann Allergy.* 1984; 53:26-29.
16. Davies R, Pepys J. Occupational asthma. In: Clark TJH, editor. *Asthma*. London: Ed. Chapman and Hall, 1977; p. 190.
18. Jogi R, Janson C, Boman G, Bjorksten B. Bronchial hyperresponsiveness in two populations with different prevalence of atopy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8(10):1180-1185.
26. Trigg CJ, Bennet JB, Tooley M et al. A general practice based survey of bronchial hyperresponsiveness and its relation to symptoms, sex, age, atopy and smoking. *Thorax.* 1990; 45:866-872.
27. Ernst P, Ghezzi H, Becklake MR. Risk factors for bronchial hyperresponsiveness in late childhood and early adolescence. *Eur Respir J.* 2002; 20:635-639.
28. Woolcock AJ. Asthma. In: Murray JF, Nadel JA, eds. *Textbook of Respiratory Medicine*, vol 2. Philadelphia: Ed. WB Saunders Comp, 1994; p. 1303-1304.
30. Chinn S, Jarvis DR, Luczynska CM, Ackermann-Liebrich U et al. An increase in bronchial responsiveness is associated with continuing or restarting smoking. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172(8):956-961.
31. Minov J, Karadzinska-Bislimovska J, Vasilevska K et al. Effects of passive smoking at work on respiratory symptoms, lung function and bronchial responsiveness in never-smoking office cleaning women. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009; 63(3):327-334.
32. Mamuya SH, Bratveit M, Mwaiselage J, Moet BE. Variability of exposure and estimation of cumulative exposure in a manually operated coal mine. *Ann Occup Hyg.* 2006; 50(7):737-745.
33. Cowie RL, Mabena SK. Silicosis, chronic airflow limitation and chronic bronchitis in South African gold miners. *Am Rev Respir Dis.* 1991; 143:80-84.

34. Haber P, Tashkin DP, Simmons M et al. Effect of occupational exposures on decline of lung function in early chronic obstructive pulmonary disease. *J Occup Environ Med.* 2007; 49(10):1143-1148.
47. Frans A, van den Eeckhaut J. Cough as the sole manifestation of airway hyperreactivity. *JLO.* 1989; 103(7):680-682.
59. Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST. Airway remodelling in asthma and novel therapy. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2013; 31(1):3-10.
60. Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergology International.* 2007; 56:331-340.
61. Descalzi D, Folli C, Scordamaglia F et al. Importance of fibroblasts-myofibroblasts in asthma-induced airway remodeling. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2007; 1(3):237-41.
65. Guenard H, Ronatbi S. Physiological aspects of the decline of pulmonary function with age. *Rev Mal Respir.* 2004; 21(5):13-24.
66. Quanjar PH, Tammeling GJ, Cotes JE. Standardized lung function testing. *Eur Respir J.* 1993; 10:1683-1693.
79. Xu X, Dockery DW, Ware JH et al. Effects of cigarette smoking on rate of loss of pulmonary function in adults: a longitudinal assessment. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 146:1345-1348.
76. Bakke B, Ulvestad B, Stewart P, Eduard W. Cumulative exposure to dust and gases as determinants of lung function decline in tunnel construction workers. *Occup Environ Med.* 2004; 61(3):262-269.
82. Churg A, Wright JL. Small – airways lesions in patients exposed to nonasbestos mineral dusts. *Human Pathol.* 1983; 14:688-693.
83. Kozlov I, Cocâră A, Bocşa H. Small airways obstruction in silicosis. *Clujul Medical.* 2001; 74(3):327-336.
85. Riemersmaa R, Dirkje P, Kerstjens H et al. Development of a questionnaire for the assessment of bronchial hyperresponsiveness. *Primare Care Resp J.* 2009; 18(4):287-293.
97. Bergren DR. Environmental tobacco smoke exposure and airway hyperresponsiveness. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009; 8(5):340-7.
98. Steinman HA, Donson H, Kawalski M, Toerien A, Potter PC. Bronchial hyper-responsiveness and atopy in urban, peri-urban and rural South African children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003; 14(5):383-93.
99. Sunyer J, Anto JM, Kogevinas M et al. Smoking and bronchial responsiveness in nonatopic and atopic young adults. Spanish Group of the European Study of Asthma. *Thorax.* 1997; 52(3):235–238.
101. Rijcken B, Scouten JP, Weiss ST et al. The relationship of non-specific bronchial hyperresponsiveness to respiratory symptoms in a random population sample. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136:62-68.
102. Mortagy AK, Howell JB, Waters WE. Respiratory symptoms and bronchial reactivity: identification of a syndrome and its relation to asthma. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986; 293(6546):525-9.

103. Woolcock AJ, Peat JK, Salome CM et al. Prevalence of bronchial hyperresponsiveness and asthma in a rural adult population. *Thorax*. 1987; 42:361-368.
104. Sears MR, Jones DT, Holdaway MD et al. Prevalence of bronchial reactivity to inhaled methacholine in New Zealand children. *Thorax*; 1986, 41:283-289.
112. Petran M, Cocârlă A, Băiescu M. Association between bronchial hyper-reactivity and exposure to silicon carbide. *Occup Med (Lond)*. 2000; 50(2):103-6.
113. Cocârlă A, Olteanu A, Modorcea V. Surveillance of ventilation functions in collectives occupationally exposed to the risk of COPD. *Rev Ig Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol Pneumoftiziol Pneumoftiziol*. 1989; 38(4):353-8.
114. Mihălțan F, Ulmeanu R. *Bronhopneumopatia cronică obstructivă*. Ed. Orizonturi, București, 1966.