

L'interazione tra steroidi inalatori e particolato da fumo passivo: una nuova luce sulla "steroid resistance"

Inhaled steroid/tobacco smoke particle interactions: a new light on steroid resistance

Giovanni Invernizzi, Ario Ruprecht, Cinzia De Marco, Roberto Mazza, Gabriele Nicolini, Roberto Boffi

Riassunto

Introduzione. La resistenza agli steroidi per via inalatoria è un ostacolo al controllo dell'asma nei fumatori asmatici. Le ragioni di questo fenomeno non sono ancora del tutto comprese. L'interazione di particelle di farmaco con il fumo di tabacco ambientale (ETS-Environmental Tobacco Smoke) potrebbe alterare il profilo aerodinamico del farmaco attraverso il fenomeno della coagulazione delle particelle. Scopo dello studio è stato quello di studiare se le particelle degli steroidi interagiscono con il fumo in presenza di ETS.

Materiali e Metodi. Il profilo delle particelle di Beclometasone-hydrofluoralkane (BDP-HFA) è stata studiata dopo una singola somministrazione in aria ambiente o in presenza di ETS, in una camera sperimentale, mediante un contatore ottico di particelle in grado di misurare particelle di dimensioni 0,3-1,0, 1,1- 2,0, 2,1-3,0, 3,1-4,0, 4,1-5,0, e >5.1 micron di diametro, con un tempo di campionamento di un secondo. Il numero di particelle di farmaco dopo una singola somministrazione è stato valutato come differenza tra il numero di particelle totali dopo la somministrazione del farmaco e il numero di particelle di fondo. Sono stati condotti due gruppi di esperimenti a diverse concentrazioni di particelle nel background ambientale. Per l'analisi statistica è stato usato il test t di Student a due code.

Risultati. Quando erogate nell'aria ambiente, oltre il 90% delle particelle di BDP-HFA ha una dimensione di 0,3-1,0 micron, mentre le particelle di dimensioni 1.1-2.0 micron e 2,1-3,0 rappresentano meno del 6,6% e 2,8% del totale, rispettivamente. Invece, quando il farmaco viene erogato in presenza di ETS, il suo profilo viene modificato, con un calo impressionante delle particelle di 0,3-1,0 micron; le particelle più rappresentate risultano quindi quelle con dimensioni 1.1-2.0 micron (oltre il 66,6% delle particelle totali), e quelle da 2.1-3.0 micron rappresentano fino al 31% delle particelle totali.

Conclusioni. I nostri dati suggeriscono che l'interazione tra le particelle di BDP-HFA e ETS avviene nei primi secondi dopo

Summary

Introduction. Inhaled steroid resistance is an obstacle to asthma control in asthmatic smokers. The reasons of this phenomenon are not yet entirely understood. Interaction of drug particles with environmental tobacco smoke (ETS) could change the aerodynamic profile of the drug through the particle coagulation phenomenon. Aim of the present study was to examine whether steroid particles interact with smoke when delivered in the presence of ETS.

Materials and methods. Beclomethasone-hydrofluoralkane (BDP-HFA) pMDI particle profile was studied after a single actuation delivered in ambient air or in the presence of ETS in an experimental chamber using a light scattering Optical Particle Counter capable of measuring the concentrations of particle sized 0.3–1.0, 1.1–2.0, 2.1–3.0, 3.1–4.0, 4.1–5.0, and > 5.1 μm in diameter with a sampling time of one second. The number of drug particles delivered after a single actuation was measured as the difference between total particle number after drug delivery and background particle number. Two groups of experiments were carried out at different ambient background particle concentrations. Two-tail Student's t-test was used for statistical analysis.

Results. When delivered in ambient air, over 90% of BDP-HFA particles were found in the 0.3–1.0 μm size class, while particles sized 1.1–2.0 μm and 2.1–3.0 represented less than 6.6% and 2.8% of total particles, respectively. However, when delivered in the presence of ETS, drug particle profile was modified, with an impressive decrease of 0.3–1.0 μm particles, the most represented particles resulting those sized 1.1–2.0 μm (over 66.6% of total particles), and 2.1–3.0 μm particles accounting up to 31% of total particles.

Conclusions. Our data suggest that particle interaction between inhaled BDP-HFA pMDI and ETS takes place in the first

Giovanni Invernizzi, Ario Ruprecht, Cinzia De Marco, Roberto Mazza, Roberto Boffi (roberto.boffi@istitutotumori.mi.it)
Tobacco Control Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori/SIMG (Società Italiana di Medicina Generale), Milano

Gabriele Nicolini
Dipartimento di Scienze Cliniche,
Università degli Studi di Parma

l'erogazione del farmaco, con una diminuzione del numero delle particelle più piccole e un concomitante aumento di quello delle particelle più grandi. Le conseguenti modifiche del profilo delle particelle nell'aerosol potrebbe modificare la deposizione regionale del farmaco, con un potenziale danno al grado di efficacia dei farmaci, e rappresentare un nuovo elemento della resistenza agli steroidi nei fumatori. Sebbene il presente studio non fornisca alcuna valutazione funzionale o clinica, potrebbe essere utile consigliare ai fumatori e ai non fumatori con malattie polmonari ostruttive come l'asma o la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), di evitare l'uso di farmaci per via inalatoria in presenza di ETS al fine di ottenere il miglior effetto terapeutico.

Parole chiave: *fumatore, asma, BPCO, Beclometasone, resistenza agli steroidi, inquinamento ambientale da fumo.*

Introduzione

L'ETS è una delle cause più comuni di inquinamento indoor [2] riconosciuto in tutto il mondo come fattore di rischio per le malattie respiratorie [3,4]. Ciò nonostante, una rilevante percentuale di soggetti asmatici riporta essere fumatore (il 35% degli asmatici presentatosi in pronto soccorso [5], il 26% di oltre 4000 pazienti ambulatoriali in una recente indagine [6]), e molti asmatici non fumatori sono esposti a ETS [7].

Anche se gli steroidi per via inalatoria sono il cardine della terapia per l'asma, la loro efficacia si riduce drasticamente negli asmatici fumatori, compromettendo il controllo dell'asma e dando origine ad un fenomeno chiamato "steroid resistance" [8-11].

Finora, le possibili interazioni tra le particelle di farmaco e l'ETS non sono state considerate come possibile spiegazione per la resistenza agli steroidi per via inalatoria. Se il farmaco viene fornito in presenza di ETS, le particelle possono interagire con il fumo di tabacco modificandone la distribuzione rispetto al modello originale, con un aumento delle particelle più grandi. Dal momento che la dimensione delle particelle di farmaco rappresenta un problema critico per la deposizione regionale del farmaco per via inalatoria, un cambiamento nel profilo aerodinamico potrebbe essere dannoso per il suo effetto clinico [12].

Secondo le linee guida farmaceutiche, gli steroidi per via inalatoria vengono studiati in aria ambiente [13], non considerando la cattiva qualità dell'aria nelle case inquinate da ETS, dove i farmaci per via inalatoria sono spesso utilizzati. Lo scopo del presente studio è stato quello di indagare se la distribuzione delle particelle di beclometasone-hydrofluoralkane predosato in inalatore pressurizzato (BDP-HFA pMDI) viene modificata quando il farmaco viene erogato in presenza di ETS.

Materiali e Metodi

È stata condotta una serie di esperimenti misurando la distribuzione delle particelle di BDP-HFA pMDI in aria ambiente e nella stessa addizionata di fumo di tabacco

few seconds after drug delivery, with a decrease in smaller particles and a concurrent increase of larger particles. The resulting changes in aerosol particle profile might modify regional drug deposition with potential detriment to drug efficacy, and represent a new element of steroid resistance in smokers.

Although the present study does not provide any functional or clinical assessment, it might be useful to advise smokers and non smokers with obstructive lung disease such as asthma or COPD, to avoid to act inhaled drugs in the presence of ETS in order to obtain the best therapeutic effect.

Keywords: *smoker, asthma, COPD, Beclomethasone, steroid resistance, environmental tobacco smoke.*

prodotto da una sigaretta lasciata consumare fino a 0,5 cm dal filtro. A tale scopo è stato utilizzato un contatore di particelle a diffrazione laser (modello 9012, Metone, Grants Pass, USA) capace di misurare le particelle nei seguenti range di dimensione: 0.3–1.0, 1.1–2.0, 2.1–3.0, 3.1–4.0, 4.1–5.0, e > 5.1 μm con un tempo di campionamento di 1 secondo [14]. L'analizzatore era posto all'interno di una camera acrilica avente un'area di 6,5 m³, attrezzata con dispositivi per il controllo dell'umidità relativa e della temperatura e con la superficie interna rivestita di vernice antistatica per evitare perdite di particelle dovute a cariche elettrostatiche. La temperatura nella camera era posta tra i 21 e i 22°C, mentre l'umidità relativa tra il 45 e il 55%. Lo studio è stato condotto fornendo una sola erogazione di BDP-HFA pMDI in due differenti condizioni: a) in aria ambiente, e b) in presenza di ETS. La miscelazione dell'aria nella camera era assicurata da due ventilatori posti all'interno della camera stessa. L'aria della camera veniva completamente cambiata dopo ogni test.

Per ciascun esperimento, il numero delle particelle di BDP-HFA pMDI è stato calcolato sottraendo la concentrazione delle particelle nel background (media delle ultime 100 misurazioni prima dell'erogazione del farmaco) dalla media delle prime 100 misurazioni del numero di particelle totali registrate dopo l'erogazione.

Sono stati condotti due differenti gruppi di esperimenti (Tests group 1 e Tests group 2) a tempi diversi usando lo stesso setting di laboratorio ma con contatori di particelle con diverso numero di serie e a diverse concentrazioni di particelle di background; queste ultime, dopo l'aggiunta di ETS, erano simili nei diversi esperimenti. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test t di Student a due code.

Risultati

La Figura 1 (tests group 1) mostra la media \pm SD della frequenza delle particelle di BDP-HFA pMDI: quando questo viene erogato in aria ambiente il $90.20 \pm 0.97\%$ del farmaco era rappresentato da particelle di 0.3–1.0 μm , mentre le particelle da 1.1–2.0 e 2.1–3.0 erano, rispettivamente, il

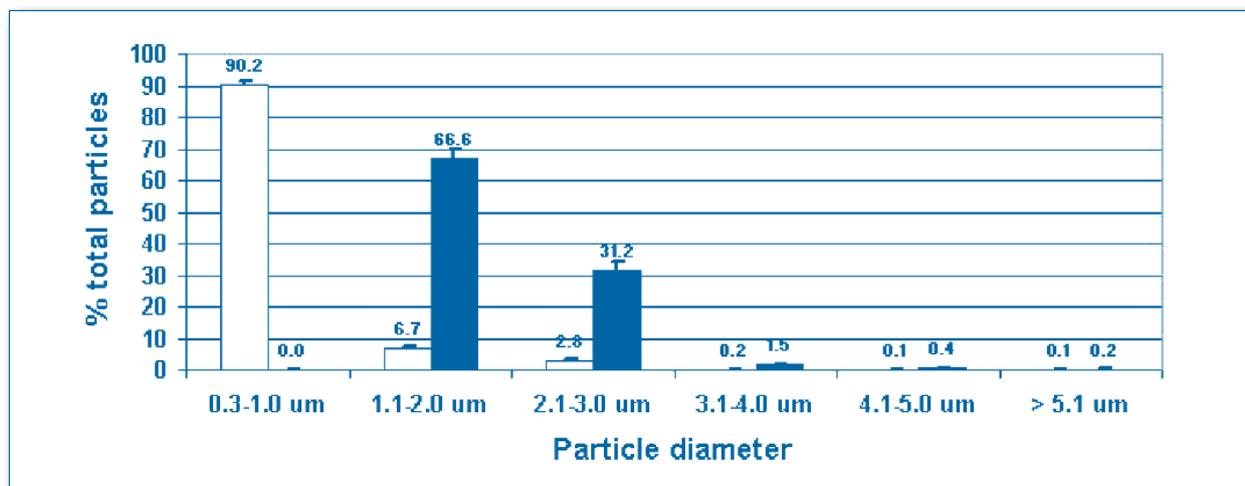


Fig.1 Tests group 1. Particle frequency of BDP-HFA pMDI delivered in ambient air (open columns) and in ETS (black columns). Particles sized 0.3–1.0 µm, which predominated in ambient air, were no longer measurable in ETS, particles in the range of 1.0 to 3.0 µm in diameter being mostly represented.

6.66 ± 0.54% e 2.78 ± 0.40% del totale; le particelle oltre i 3.1 µm di diametro erano invece meno dell'1%.

Quando lo stesso set di esperimenti è stato effettuato in presenza di ETS, la distribuzione del diametro delle particelle era cambiato con un decremento significativo del numero di particelle da 0.3–1.0 µm rispetto al background. È stato misurato invece un elevato numero di particelle più grandi rispetto a quello misurato in aria ambiente.

Come mostrato in fig. 1, la media ± SD della frequenza delle particelle di BDP-HFA pMDI erogato in ETS (colonne scure) era molto diversa se comparata al profilo delle particelle di farmaco erogato in aria ambiente (colonne chiare): le particelle di dimensioni 0.3–1.0 µm scompaiono mentre predominano quelle di dimensioni 1.1–2.0 µm e 2.1–3.0

µm con una percentuale media ± SD di 66.62 ± 2.92 and 31.16 ± 2.97 rispettivamente. Infine le particelle di dimensioni 3.1–4.0 µm, 4.1–5.0 e 5.1 µm in diametro si attestano su valori inferiori al 2%.

Un altro set di esperimenti (tests group 2) è stato condotto utilizzando lo stesso modello di analizzatore ma con diverso numero di serie e con condizioni diverse di background.

La figura 2 mostra la media ± SD della frequenza delle particelle di BDPHFA pMDI quando effettuati in aria ambiente (colonne chiare): i dati erano simili a quelli del gruppo 1, con predominanza di particelle con diametro 0.3–1.0 µm che rappresentano il 96.08 ± 0.93% delle particelle totali, mentre le particelle da 1.1–2.0 e 2.1–3.0 µm

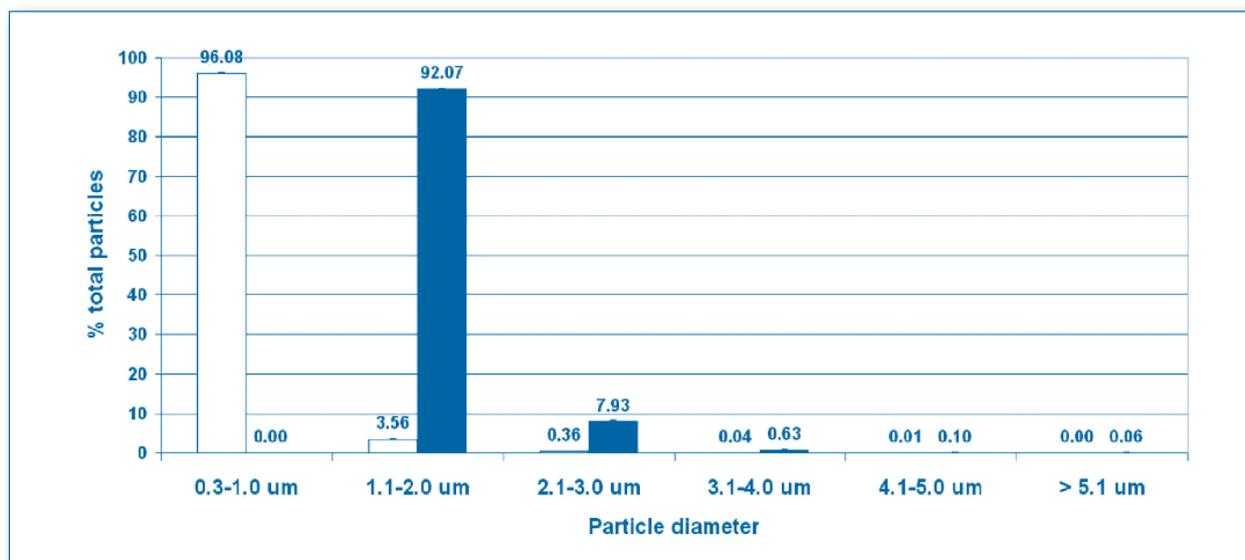


Fig.2 Tests group 2. Particles frequency of BDP-HFA pMDI delivered in ambient air (open columns) and in ETS (black columns). Particles sized 0.3–1.0 µm, which predominated in ambient air, were again no longer measurable in ETS, particles in the range of 1.0 to 3.0 µm in diameter being mostly represented.

si attestavano allo $3.56 \pm 0.52\%$ e $0.36 \pm 0.04\%$ rispettivamente; le particelle oltre i $3.1 \mu\text{m}$ di diametro erano meno dell'1%.

Come mostrato in figura 2 la media \pm SD della frequenza delle particelle di farmaco erogato in ETS (colonne scure) cambia se confrontata con il profilo del farmaco erogato in aria ambiente (colonne chiare): le particelle da $0.3\text{--}1.0 \mu\text{m}$ scompaiono mentre quelle da $1.1\text{--}2.0 \mu\text{m}$ e $2.1\text{--}3.0 \mu\text{m}$ predominano con una media percentuale \pm SD di 92.07 ± 0.1 e 7.93 ± 0.3 rispettivamente; le particelle oltre i $3.1 \mu\text{m}$ di diametro rappresentano meno dell'1% del totale delle particelle.

Discussione

I nostri risultati indicano che la distribuzione granulometrica dello steroide in presenza di ETS può variare, con uno spostamento verso le dimensioni maggiori in pochi secondi. Nei due gruppi di esperimenti con differenti background ambientali e in presenza di ETS si evidenzia la scomparsa delle particelle con diametro $0.3\text{--}1.0 \mu\text{m}$ e un incremento di quelle di $1.1\text{--}2.0$ e $2.1\text{--}3.0 \mu\text{m}$.

Abbiamo scelto la formulazione BDP extrafine perché è lo steroide inalatorio più usato e perché è l'unico corticosteroide incluso nella lista dei farmaci essenziali dell'Organizzazione Mondiale della Sanità [15]. La deposizione bronchiale dei farmaci dipende dal diametro delle particelle; più sono piccole e più facilmente raggiungono le regioni più periferiche del polmone [16-18]. Grazie al profilo extra fine di BDP-HFA pMDI, lo spostamento verso classi aerodinamiche più grandi non genera un aumento della percentuale di particelle $> 5.1 \mu\text{m}$; viene così preservata la capacità del farmaco di raggiungere i polmoni. Solo le particelle con diametro $< 6.0 \mu\text{m}$, infatti, sono considerate adatte a questo scopo [16-18]. L'aumento delle dimensioni delle particelle potrebbe, invece, cambiare la deposizione del farmaco nelle piccole vie respiratorie che sono coinvolte nei processi infiammatori e bronco costrittori nell'asma e nella (BPCO) anche se tale principio non è automaticamente applicabile ad altri farmaci. Ad esempio Usmani e collaboratori riferiscono che per il beta-agonista albuterolo le particelle più grossolane sono più efficaci di quelle piccole [17].

L'interazione con l'ETS riguarda soprattutto i fumatori a causa del fumo di tabacco residuo che permane nei polmoni per alcuni minuti dall'ultima boccata [14] ed anche perché sono esposti all'ETS da loro stessi prodotto. Comunque anche i soggetti non fumatori, specialmente i bambini, rischiano di assumere farmaci inalatori alterati dall'ETS e ciò è dovuto al fatto che il fumo di tabacco in casa è ancora la maggiore causa di esposizione a fumo secondario [19].

Sebbene il fumo attivo e passivo siano considerati importanti fattori di rischio per le esacerbazioni dell'asma, e nonostante il fatto che il problema dello scarso controllo dell'asma nei fumatori stia attirando l'attenzione anche nell'ambito delle cure primarie [6,20], nelle linee guida e

raccomandazioni per l'asma non è riportato alcun consiglio speciale per evitare interferenze del fumo di tabacco quando si utilizzano farmaci per via inalatoria [12,20-26].

Solo il paragrafo dedicato alla pentamidina aerosol nebulizzatore nel "The British Society Nebulizer Study Group Report" raccomanda che "i pazienti non dovrebbero fumare sigarette nelle due ore precedenti il trattamento" [21].

Tuttavia, se l'interazione tra farmaco e ETS può essere un problema per i fumatori asmatici, lo è ancora di più per i pazienti con BPCO; il 50% di questi, infatti, in terapia con farmaci inalatori è fumatore [26,27]. Nel foglietto illustrativo del farmaco, inoltre, non vengono fornite indicazioni riguardo alle modalità di somministrazione rispetto all'abitudine tabagica né riguardo ai livelli di inquinamento della stanza nella quale il farmaco viene utilizzato.

I risultati ottenuti con gli analizzatori laser sono consistenti e attendibili, tuttavia queste metodologie hanno alcune limitazioni quali ad esempio la possibile interferenza dovuta alla perdita di particelle ad elevate concentrazioni: quindi i dati riferiti alle particelle da $0.3\text{--}1.0 \mu\text{m}$ sono stati corretti tramite un'equazione appropriata.

Un'altra limitazione di queste tecnologie è che queste misurano il numero e la dimensione delle particelle ma non il tipo né la loro massa. I risultati sono quindi solo indicativi di coagulazione delle particelle. Sono necessari, pertanto, ulteriori studi con differenti metodologie, come per esempio la microscopia elettronica e l'impactor a cascata di Andersen, per fornire altre informazioni e confermare la presenza di questo fenomeno [13]. Come per temperatura e umidità relativa, l'aggiunta di ETS nella camera non altera questi parametri rispetto agli esperimenti condotti in aria ambiente, probabilmente perché il fumo introdotto nella camera è in misura limitata. Altri processi fisici che possono influenzare le dinamiche dell'aerosol, come la carica elettrostatica delle particelle di ETS e le proprietà igroscopiche del farmaco per via inalatoria, potrebbero avere un ruolo nei risultati osservati, e meritano quindi ricerche appropriate [1]. Il profilo delle particelle di BDP-HFA pMDI mostra piccole differenze nei due gruppi di test condotti in aria ambiente; la frequenza era 90.2%, 6.7%, e 2.8% nel gruppo 1 e 96.2%, 3.5%, e 0.4% nel gruppo 2 per le particelle $0.3\text{--}1.0$, $1.1\text{--}2.0$, e $2.1\text{--}3.0 \mu\text{m}$ in diametro. Le differenze erano più rilevanti nei due gruppi di test condotti in ETS con una frequenza di 66.6%, 31.2%, 1.5%, and of 92.2%, 7.9%, 0.63% per particelle di $1.1\text{--}2.0$, $2.1\text{--}3.0$, e $3.1\text{--}4.0 \mu\text{m}$ in diametro. Tali discrepanze potrebbero essere spiegate dal fatto di aver utilizzato due tipi diversi di analizzatori e alle differenti condizioni di background.

Conclusioni

In sintesi, i nostri dati mostrano che il profilo delle particelle dello steroide inalatorio BDP-HFA pMDI viene modificato quando il farmaco viene erogato in presenza di ETS. Nonostante siano necessari ulteriori studi per confermare

questa evidenza e nonostante il presente studio sia stato condotto senza valutazioni clinico-funzionali, i risultati sono rilevanti per il fenomeno della resistenza agli steroidi [9]. È stato dimostrato che il fumo è in grado di inibire la risposta clinica agli steroidi sistemici attraverso meccanismi biochimici che influenzano la farmacodinamica a livello cellulare [28,29]. I nostri dati suggeriscono che l'interazione e la crescita in dimensioni delle particelle dovrebbero essere considerati come un ulteriore meccanismo che contribuisce a ridurre l'efficacia clinica degli steroidi inalatori nei fumatori, aggiungendo un nuovo elemento di prova.

È ragionevole, quindi, che i fumatori con malattie polmonari ostruttive come l'asma o la BPCO vengano informati oltre che sui metodi per smettere anche su come utilizzare il loro farmaco inalatorio, lontano, cioè, dall'ETS e dall'ultima boccata di fumo, allo scopo di ottenere il migliore effetto terapeutico. Allo stesso modo, anche i pazienti asmatici non fumatori dovrebbero ricevere istruzioni riguardo l'inquinamento indoor da ETS e la loro interazione con i farmaci inalatori. Si suggerisce, a tale proposito, l'esposizione negli ambulatori di medicina generale e nei reparti di pneumologia del cartello in appendice. ■

(Tradotto e modificato dagli Autori da: *Inhaled steroid/tobacco smoke particle interactions: a new light on steroid resistance*. Invernizzi G, Ruprecht A, De Marco C, Mazza R, Nicolini G, Boffi R. *Respir Res*. 2009 Jun 11;10:48.)

BIBLIOGRAFIA

- Hinds WC: Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles. New York:Wiley; 1999.
- Repace JL, Lowrey AH: Indoor air pollution, tobacco smoke, and public health. *Science*. 1980, 208(4443):464-472.
- US Department of Health and Human Services: Smoking and tobacco control. National Cancer Institute (NCI): Health effects of exposure to environmental tobacco smoke. In The Report of the California Environmental Protection Agency. Monograph N°10. National Institutes of Health. Bethesda (MD); 1999.
- World Health Organization: International Agency For Research On Cancer. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 83. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Lyon; 2002.
- Silverman RA, Boudreaux ED, Woodruff PG, Clark S, Camargo CA: Cigarette Smoking Among Asthmatic Adults Presenting to 64 Emergency Departments. *Chest*. 2003, 123(5):1472-1479.
- Molimard M, Le Gros V: Impact of patient-related factors on asthma control. *J Asthma*. 2008, 45(2):109-113.
- Eisner MD, Katz PP, Yelin EH, Hammond SK, Blanc PD: Measurement of environmental tobacco smoke exposure among adults with asthma. *Environ Health Perspect*. 2001, 109(8):809-814.
- Pedersen B, Dahl R, Karlstrom R, Peterson CG, Venge P: Eosinophil and neutrophil activity in asthma in a one-year trial with inhaled budesonide. The impact of smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153(5):1519-1529 [http://ajrcm.atsjournals.org/cgi/content/abstract/153/5/1519].
- Chalmers GW, Macleod KJ, Little SA, Thomson LJ, McSharry CP, Thomson NC: Influence of cigarette smoking on inhaled corticosteroid treatment in mild asthma. *Thorax*. 2002, 57(3):226-230.
- Tomlinson JE, McMahon AD, Chaudhuri R, Thompson JM, Wood SF, Thomson NC: Efficacy of low and high dose inhaled corticosteroid in smokers versus non-smokers with mild asthma. *Thorax*. 2005, 60(4):282-287.
- Lazarus SC, Chinchilli VM, Rollings NJ, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, Deykin A, DiMango E, Fish JE, Ford JG, Israel E, Kiley J, Kraft M, Lemanske RF Jr, Leone FT, Martin RJ, Pesola GR, Peters SP, Sorkness CA, Szefer SJ, Wechsler ME, Fahy JV, National Heart Lung and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network: Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175:783-90.
- ERS Task Force: European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers. *Eur Respir J*. 2001, 18(1):228-242.
- Guidance for Industry: Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler (DPI) Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. 1998 [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070573.pdf]. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
- Invernizzi G, Ruprecht A, De Marco C, Paredi P, Boffi R: Residual tobacco smoke: measurement of its washout time in the lung and of its contribution to environmental tobacco smoke. *Tob Control*. 2007, 16(1):29-33.
- WHO: Model List of Essential Medicines. 15th edition. 2007 [http://www.who.int/medicines/publications/08_ENGLISH_index-FINAL_EML15.pdf].
- Leach CL, Davidson PJ, Boudreau RJ: Improved airway targeting with the CFC-free HFA-beclomethasone metered-dose inhaler compared with CFC-beclomethasone. *Eur Respir J*. 1998, 12(6):1346-1353.
- Usmani OS, Biddiscombe MF, Barnes PJ: Regional lung deposition and bronchodilator response as a function of beta2-agonist particle size. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005, 172(12):1497-504.
- Svartengren M, Anderson M, Bylin G, Philipson K, Camner P: Regional deposition of 3.6-micron particles and lung function in asthmatic subjects. *J Appl Physiol*. 1991, 71(6):2238-2243.
- Ritchie D, Amos A, Phillips R, Cunningham-Burley S, Martin C: Action to achieve smoke-free homes- an exploration of experts' views. *BMC Public Health*. 2009, 9:112.
- Haughney J, Price D, Kaplan A, Chrystyn H, Horne R, May N, Moffat M, Versnel J, Shanahan ER, Hillyer EV, Tunsu A, Bjermer L: Achieving asthma control in practice: understanding the reasons for poor control. *Respir Med*. 2008, 102(12):1681-1693.
- British Society Nebulizer Project Group: Guidelines. *Thorax* 1997, 52(Suppl 2):S4-S16.
- Sestini P, Cappiello V, Aliani M, Martucci P, Sena A, Vaghi A, Canessa PA, Neri M, Melani AS: Prescription Bias and Factors Associated with Improper Use of Inhalers. *J Aerosol Med*. 2006, 19(2):127-136.
- National Heart, Lung, and Blood Institute: National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma Full Report 2007 [http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.pdf].
- Global Strategy for Asthma Management and Prevention Global Initiative for Asthma (GINA) 2008 [http://www.ginasthma.org/Guidelineitem.asp?i1=2&i2=1&intld=60].
- Diette GB, McCormack MC, Hansel NN, Breyse PN, Matsui EC: Environmental Issues in Managing Asthma. *Respir Care*. 2008, 53(5):602-615.
- Burge PS, Calverley PMA, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, on behalf of the ISOLDE Study Group: Prednisolone response in patients with chronic obstructive pulmonary disease: results from the ISOLDE study. *Thorax* 2003, 58:654-658.
- GOLD: Global Strategy for Diagnosis, management, and Prevention of COPD. 2008 [http://www.goldcopd.org/Guidelineitem.asp?i1=2&i2=1&intld=2003].
- Chaudhuri R, Livingston E, McMahon AD, Thomson L, Borland W, Thomson NC: Cigarette smoking impairs the therapeutic response to oral corticosteroids in chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003, 168(11):1308-1311.
- Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Camarero G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ: Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2005, 352(19):1967-1976.