

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE PNEUMO-CARDIO-TORACICHE DI INTERESSE
MEDICO E CHIRURGICO

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D1

Settore Scientifico disciplinare: MED/10

Titolo della tesi:

**Markers biologici nelle patologie
ostruttive del polmone.
Correlazioni clinico funzionali.**

Presentata da: Dott.ssa Brunilda Marku

Coordinatore Dottorato

Prof. Sandro Mattioli

Relatore

Prof. Alberto Papi

Esame finale anno 2012

Indice	<i>Page</i>
INTRODUZIONE	2
CAPITOLO 1: ASMA BRONCHIALE: DALLA PATOGENESI ALLA DIAGNOSI	
1.1 Definizione ed Epidemiologia dell'asma bronchiale	4
1.2 Eziologia e patofisiologia dell'asma bronchiale	7
1.3 Rimodellamento vie aeree	9
1.4 Diagnosi di asma	10
CAPITOLO 2: LA BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA: DALLA PATOGENESI ALLA DIAGNOSI	
2.1 Definizione ed epidemiologia della BPCO	11
2.2 Eziologia e patogenesi della BPCO	13
2.3 Fisiopatologia ed anatomia patologica	15
2.4 Diagnosi	18
CAPITOLO 3: RIACUTIZZAZIONI	
3.1 Riacutizzazioni di BPCO	19
3.2 Riacutizzazioni di asma bronchiale	27
3.3 Ruolo della risposta immunologica nelle riacutizzazioni di asma bronchiale virus indotte	32
CAPITOLO 4: DATI SPERIMENTALI	
4.1 Asma bronchiale con ostruzione fissa e BPCO: 5 anni di follow up	39
4.2 Caratteristiche cliniche e funzionali della BPCO stabile: correlazione con i parametri dell'espettorato	53
4.3 Terapia della Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO): effetto del trattamento cronico con corticosteroidi di inalatori sulla colonizzazione delle vie aeree	60
4.4 Ruolo dell'atopia e dell'asma sulla modulazione della risposta immunologia antivirale in bambini in età prescolare	77
BIBLIOGRAFIA	92
APPENDICE	106

Introduzione

L'asma bronchiale e la Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva sono due patologie infiammatorie croniche dell'apparato respiratorio con caratteristiche eziopatogenetiche, cliniche e funzionali differenti. Tuttavia una percentuale significativa di pazienti asmatici può sviluppare un'ostruzione bronchiale fissa che li rende funzionalmente indistinguibili dai pazienti con BPCO. I nostri studi hanno dimostrato che un'accurata indagine funzionale ed infiammatoria di questi pazienti può evidenziare la patologia sottostante. Inoltre lo studio longitudinale ha mostrato che la presenza di ostruzione bronchiale fissa rappresenta un fattore prognostico negativo nell'asma in quanto questi pazienti hanno un accelerato declino della funzionalità respiratoria ed un maggior numero di riacutizzazioni all'anno rispetto ai pazienti con asma bronchiale completamente reversibile. Lo stesso studio ha dimostrato che i pazienti con asma bronchiale con ostruzione fissa hanno un declino funzionale simile ai pazienti di pari età con BPCO. Tuttavia il processo infiammatorio che si associa ad un simile declino funzionale è diverso nei due gruppi: i neutrofili si associano ad un declino della funzionalità respiratoria nei pazienti BPCO gli eosinofili si associano ad un declino della funzionalità respiratoria nei pazienti asmatici. L'infiammazione nelle vie aeree rappresenta un elemento fondamentale dell'eziopatogenesi dell'asma bronchiale. I dati della letteratura dimostrano che l'infiammazione aumenta con la severità della malattia, aumenta in corso di riacutizzazione ed in corso di scarso controllo della malattia asmatica. Molto meno chiari sono le correlazioni tra i cambiamenti dell'infiammazione e i cambiamenti dei sintomi dei pazienti con BPCO. Il nostro studio per la prima volta ha dimostrato che non vi è correlazione tra sintomi e funzionalità respiratoria nei pazienti con BPCO. Tuttavia cambiamenti dei sintomi si associano a specifici cambiamenti dell'infiammazione. Un aumento della tosse si associa ad un aumento relativo dei neutrofili, mentre un aumento della dispnea si associa ad un aumento degli eosinofili. Quali siano i fattori che stanno alla base di queste correlazioni non è attualmente noto. Classicamente l'infiammazione neutrofilica nei pazienti con BPCO è stata associata alla presenza di infezione batterica. I pazienti con BPCO infatti presentano una colonizzazione batterica delle vie aeree anche in corso di stabilità clinica. Non è noto se la terapia inalatoria, ed in particolare i corticosteroidi per via inalatoria per quali è stato descritto un possibile effetto proinfettivo, possano favorire la colonizzazione batterica dei pazienti con BPCO. Il nostro studio per la prima volta ha evidenziato che l'uso dei corticosteroidi per via inalatoria si associa ad una maggiore carica batterica nelle vie aeree e ad un più frequente isolamento di microbi potenzialmente patogeni nelle vie aeree dei pazienti BPCO. Le infezioni batteriche e le infezioni virali sono le cause principali di riacutizzazione sia di

BPCO che di asma bronchiale. Recentemente è stato dimostrato che i pazienti asmatici hanno una risposta immunologica innata deficitaria nei confronti delle infezioni virali e che tale meccanismo giustifica la maggiore suscettibilità di questi pazienti nei confronti di infezioni virali. Questi dati sono stati descritti in popolazioni di pazienti asmatici adulti ed atopici. Non è noto se la deficitaria risposta immunologica innata sia una caratteristica intrinseca (ovvero presente fin dalla nascita) o se sia la conseguenza di una modulazione dell'infiammazione presente in corso degli anni. Per tale motivo abbiamo studiato la risposta immunologica innata nei confronti delle infezioni virali in un modello ex vivo di cellule epiteliali bronchiali di una coorte di bambini in età prescolare asmatici e/o atopici e rispettivi controlli. I risultati dimostrano che la risposta immunologica innata antivirale è deficitaria fin dai primi anni di vita nei pazienti asmatici ma che tuttavia è deficitaria anche nei bambini atopici in assenza di un fenotipo asmatico evidente. I dati suggeriscono che possa essere l'atopia uno dei fattori che condizioni la deficitaria risposta.

CAPITOLO 1

Asma bronchiale: dalla patogenesi alla diagnosi

1.1 Definizione ed Epidemiologia dell'asma bronchiale

Come indicato nelle linee guida internazionali del Global Initiative for Asthma (GINA) l'asma bronchiale è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree in cui numerose cellule e mediatori dell'infiammazione giocano un ruolo patogenetico fondamentale. In individui predisposti tale infiammazione causa episodi ricorrenti di respiro sibilante, dispnea, senso di costrizione toracica e tosse soprattutto durante la notte e durante le prime ore del mattino. Tali episodi in genere si associano ad ostruzione bronchiale variabile che in genere risulta reversibile spontaneamente o dopo adeguata terapia, da iperattività bronchiale e da un accelerato declino della funzionalità respiratoria che può evolvere in alcuni casi in un ostruzione irreversibile delle vie aeree [1].

Un elemento cardine della patogenesi dell'asma bronchiale è rappresentato dall'iperattività bronchiale (BHR). Con il termine di BHR si intende un disordine funzionale complesso delle vie aeree caratterizzato da una maggiore sensibilità delle vie aeree a stimoli broncocostrittori, che comporta una maggiore risposta broncocostrittrice e un aumento della massima risposta ottenibile in seguito alla inalazione di un agente in grado di indurre contrazione della muscolatura bronchiale [2]. In altre parole, pazienti con iperattività bronchiale si broncocostringono a livelli inferiori di intensità di stimolo e producono una più marcata ostruzione del flusso aereo in risposta ad agenti broncocostrittori rispetto ai soggetti normali. Stimoli broncocostrittori possono essere sia di natura fisica (esercizio fisico, nebbia ultrasonica, aerosol ipertonici o ipotonici di NaCl) che di natura farmacologica (istamina e metacolina). Tale fenomeno può essere studiato valutando la caduta del FEV1 (espressione diretta dell'aumento delle resistenze lungo le vie aeree) in relazione alla concentrazione dell'agente broncocostrittore somministrato al paziente [3]. L'iperattività bronchiale è una condizione tipica dell'asma bronchiale tuttavia si può manifestare anche in altre condizioni patologiche quali la BPCO, la rinite, la sinusite, la fibrosi cistica e la sarcoidosi.

I meccanismi patogenetici che sottendono all'iperattività bronchiale non sono ancora completamente noti. Vengono chiamati in causa fattori quali predisposizione genetica (associata all'atopia) e fattori ambientali (ad esempio infezioni virali) che porterebbero ad un'attivazione di riflessi assonali, infiammazione bronchiale con attivazione di eosinofili,

mastociti, linfociti e conseguente rilascio di mediatori della flogosi, alterazione della funzione ed ipertrofia della muscolatura liscia bronchiale e danno epiteliale.

Il tono broncomotore è regolato dal sistema nervoso autonomo e, in particolare dal nervo vago (sistema eccitatorio colinergico), dal simpatico (sistema inibitorio adrenergico) e da una terza componente non adrenergica e non colinergica detta NANC. Alterazioni primitive a carico di questi sistemi di controllo o secondarie indotte da infiammazione acuta o cronica e/o danno dell'epitelio bronchiale, possono portare ad un quadro di iperreattività bronchiale [4].

Da un punto di vista clinico la diagnosi di asma si basa sulla storia clinica del paziente, l'esame obiettivo e sulla documentazione strumentale dell'ostruzione bronchiale o della iperreattività bronchiale [1]. Lo studio dell'ostruzione bronchiale viene eseguito mediante spirometria che consente di misurare: la capacità vitale (VC) che tiene conto del massimo volume di aria che può essere inspirato ed esalato durante una manovra lenta (VC) o forzata (FVC); il FEV1 o VEMS (volume di espirazione forzata in un secondo) che rappresenta il volume espirato durante il primo secondo di una espirazione forzata dopo una inspirazione massimale e rappresenta quindi un indice di quanto rapidamente i polmoni sono in grado di svuotarsi in espirazione dopo una inspirazione massimale ovvero delle resistenze che il flusso aereo incontra attraverso le vie aeree; il rapporto FEV1/VC che rappresenta il FEV1 come percentuale della VC e FVC e fornisce un utile indice clinico di limitazione al flusso aereo; il PEF (picco di espirazione forzata) che rappresenta il massimo flusso espiratorio che può essere raggiunto durante l'espirazione forzata [5].

L'asma è una patologia a diffusione ubiquitaria sul globo terrestre [6]. Tuttavia i tassi di incidenza e prevalenza differiscono notevolmente tra uno Stato e l'altro. Tale differenza potrebbe in parte anche essere imputabile alle difficoltà nel definire in modo univoco l'asma stesso e all'ampia variabilità di sensibilità e specificità degli strumenti utilizzati negli studi epidemiologici per definire la presenza di tale malattia quali: sintomi, diagnosi di asma posta da un medico, uso di farmaci antiastmatici e documentazione di iperreattività bronchiale.

Si può affermare che morbilità e incidenza sono tuttora in aumento, specialmente nei Paesi industrializzati [7-9]. La causa di questo incremento non è attualmente chiarita. Sono stati chiamati in causa fattori quali aumento dell'atopia, maggiore esposizione ad allergeni, inquinamento, cambiamento delle condizioni di vita e modificazioni della dieta [10,11]. Un fattore emergente apparentemente associato all'incremento dell'asma allergico e all'insorgenza dell'atopia è la riduzione di malattie infettive quali epatite A [12], morbillo [13] e TBC [14] nei Paesi industrializzati come risultato di miglioramenti nello stile di vita e delle vaccinazioni. Alcune malattie virali e batteriche infatti potrebbero prevenire l'atopia

attivando una risposta Th1 e producendo INF γ che, come è noto, interferisce sulla differenziazione delle cellule T coinvolte nella risposta allergica inducendo uno switch Th2-Th1 [15-17].

In Italia come in altre nazioni Europee la prevalenza dell'asma bronchiale nella popolazione generale è del 4-5 % con un tasso di incidenza globale di 3-4 casi ogni 1000 abitanti all'anno. Prevalenze più elevate si riscontrano negli USA (7%) e soprattutto in Australia e Nuova Zelanda (11-14%) fino a punte massime rilevate in alcune isole Oceaniche (Tristan da Cunha 25, Caroline Occidentale oltre 30%) [18,19].

Per quanto riguarda l'età, l'asma insorge con notevole frequenza in età infantile (prevalenza 10-15%, incidenza età inferiore ai 5 anni 10 casi ogni 1000 bambini all'anno) rappresentando la più comune malattia cronica e la principale causa di ricoveri ospedalieri nell'infanzia. Si può poi osservare un'attenuazione dei sintomi asmatici, o anche la scomparsa, in un 20-30% dei casi, all'epoca della pubertà soprattutto nei soggetti di sesso maschile. Un secondo picco di alta frequenza dell'asma bronchiale si riscontra in età adulta (prevalenza 2,5%, incidenza 2 casi ogni mille all'anno). Il sesso maschile è nettamente più colpito nei casi di asma infantile (2 maschi:1 femmina) mentre nell'adolescenza e nell'età adulta non c'è differenza tra i due sessi. La familiarità sembra giocare un ruolo importante nella precocità di comparsa dell'affezione. Per quanto riguarda i fattori ambientali la prevalenza è maggiore nelle aree urbane e nelle nazioni industrializzate.

Anche la mortalità è estremamente variabile da nazione a nazione in relazione a diversi fattori tra i quali ricordiamo: l'aumento della gravità dell'asma stesso ma soprattutto la scarsa compliance da parte del paziente alla terapia prescritta e l'inadeguata valutazione della gravità, sia da parte del paziente che da parte della struttura sanitaria. Tuttavia è importante sottolineare come l'incremento di prevalenza dell'asma non si accompagna ad un consensuale incremento di mortalità suggerendo che le terapie intraprese nel corso degli ultimi anni sono state in grado di agire riducendo la gravità della malattia e quindi il numero di morti per asma [20].

Per quanto riguarda l'Italia il tasso di mortalità rilevata negli anni dal 1985 al 1987 era del 4.1/100000 con un aumento del 28% dal 1980 al 1987 [21]. In seguito al maggior utilizzo di steroidi inalatori, come suggerito dalle linee guida, il tasso di mortalità nel nostro Paese si è leggermente ridotto e viene attualmente stimato pari a circa 3-3.5/100000, valori corrispondenti a 1700-2000 morti per asma all'anno [22].

1.2 Etiologia e Patofisiologia dell'asma bronchiale

L'etiologia dell'asma è complessa e multifattoriale essendo il risultato di un'interazione tra fattori genetici ed ambientali. Vi è oramai unanime consenso nel considerare l'asma una patologia eterogenea e che possano esistere differenti fenotipi di asma con differenti meccanismi patofisiologici. La maggior parte degli sforzi condotti in ambito di ricerca hanno focalizzato fino ad ora l'attenzione sul ruolo patogenetico dell'atopia, vista la forte relazione tra stato atopico e asma bronchiale. Tuttavia meccanismi non atopici possono avere un ruolo importante nella patogenesi dell'asma e la solidità dell'associazione tra asma e atopia è stata recentemente messa in discussione [23].

L'asma è stato a lungo considerato come una malattia ereditabile e stime suggeriscono che il 40-60% del rischio di sviluppare tale malattia sia attribuibile a fattori genetici [24]. Tuttavia fattori genetici, sebbene importanti non rappresentano i solo determinanti dell'espressione della malattia. Fattori ambientali in individui predisposti influenzano la suscettibilità a sviluppare l'asma. Allergeni e fattori di esposizione professionali sono considerati le cause più importanti di asma bronchiale, con la consapevolezza che essi possono inizialmente sensibilizzare le vie aeree e successivamente mantenere l'asma attivo causando una cronicizzazione dell'infiammazione bronchiale che porta ad attacchi ricorrenti di asma o persistenza dei sintomi. Mentre il ruolo centrale delle infezioni e in particolare delle infezioni virali nelle riacutizzazioni di asma è ben documentato, molti studi sono giunti a conclusioni contraddittorie riguardo l'associazione tra infezioni ed insorgenza di asma [25]. Infatti alcuni studi hanno evidenziato come le infezioni durante la prima infanzia proteggono contro lo sviluppo di malattie allergiche come l'asma. Tale teoria è nota come la "teoria igienica". Viceversa altri studi hanno messo in evidenza una relazione tra le infezioni durante la prima infanzia ed un aumentato rischio di sensibilizzazione allergica e di sviluppo di asma più avanti nel corso della vita [25]. Vi sono oggi numerose evidenze sia in vitro che in vivo che sottolineano come l'atopia sia il risultato di uno squilibrio della risposta immunologica. Nel 1986 Mosmann descrisse per la prima volta 2 differenti popolazioni di linfociti T tenendo conto del diverso pattern di citochine che tali cellule sono in grado di produrre (26). Cellule CD4⁺ T che producono principalmente interleuchina (IL)-2 and interferon- γ (IFN- γ) furono denominate cellule Th1 e cellule T che producono IL-4, IL-5 and IL-13 furono chiamate cellule Th2. Le citochine prodotte da ogni sottopopolazione di cellule T promuovono la crescita e l'espansione dello stesso fenotipo e la down-regulation delle cellule T del tipo opposto. Numerosi studi hanno confermato che sia la risposta immune Th1 che quella di tipo Th2 si verificano nell'uomo e che le malattie atopiche come l'asma sono caratterizzate da una

prevalente risposta immune di tipo Th2. Campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL) prelevati da pazienti con asma atopico contengono più cellule che producono mRNA per IL-4 e IL-5 rispetto ai donatori sani [27] e allo stesso modo sono stati trovati livelli più alti di mRNA per IL-4 e IL-5 in biopsie bronchiali di pazienti asmatici [28]. L'espressione di IL-4 e IL-5 è aumentata nei pazienti asmatici sintomatici rispetto a quelli asintomatici e il numero di cellule positive per IL-4 e IL-5 correla con la severità dell'ostruzione bronchiale, con la severità della BHR e con i sintomi [29]. Tali evidenze supportano il ruolo patogenetico delle cellule Th2 nell'asma.

Si ritiene che l'inalazione di antigeni ambientali rappresenti l'evento iniziante in grado di innescare la risposta immune che caratterizza l'infiammazione dell'asma bronchiale. L'antigene inalato che penetra lo strato epiteliale è catturato dalle cellule dendritiche le quali agiscono da cellule presentanti l'antigene ai linfociti B e T. In presenza di citochine Th2 (IL-4 e IL-13) i linfociti B vengono stimolati e producono IgE, le quali si legano ai recettori ad alta affinità per IgE presenti sulla superficie delle cellule mastocitarie e dei basofili. Una volta che le cellule mastocitarie sono ricoperte con IgE antigene specifiche, la successiva esposizione all'antigene causa cross-linking delle IgE, attivazione delle cellule mastocitarie ed il conseguente rilascio di mediatori bioattivi quali istamina, triptasi, eicosanoidi e radicali liberi. I mediatori rilasciati in tale fase (denominata risposta precoce) sono responsabili della comparsa acuta dei sintomi asmatici in seguito alla induzione della contrazione del muscolo liscio delle vie aeree, la secrezione di muco e la vasodilatazione. Il rilascio di cistenil-leucotrieni e altre citochine proinfiammatorie portano alla risposta asmatica ritardata, che principalmente coinvolge il reclutamento e l'attivazione di eosinofili e di cellule T e CD4+. Una volta che la fase ritardata è iniziata, gli eosinofili diventano uno dei maggiori mediatori dell'infiammazione cronica che caratterizza l'asma allergico. Gli eosinofili sono reclutati a livello polmonare grazie all'azione chemiotattica di molecole rilasciate da cellule mastocitarie e linfociti T CD4+. Tali cellule una volta attivate sono a loro volta in grado di rilasciare fattori tossici in grado di indurre danno tissutale diretto, contrazione della muscolatura liscia e aumento della permeabilità vascolare. Tale ciclo ripetitivo di danno tissutale e reclutamento di cellule infiammatorie porta a cronicizzazione dell'infiammazione [30].

1.3 Rimodellamento vie aeree

Sebbene l'asma sia definito come una malattia infiammatoria cronica caratterizzata da un'ostruzione bronchiale reversibile, è stato dimostrato che le vie aeree dei pazienti asmatici vanno incontro a modificazioni strutturali irreversibili. Le modificazioni strutturali che coinvolgono diversi componenti delle vie aeree vengono collettivamente definite "rimodellamento delle vie aeree". I cambiamenti più importanti includono iperplasia ed ipertrofia dei miociti, fibrosi subepiteliale, aumentata produzione di muco e aumento del volume delle cellule caliciformi. Altre modificazioni strutturali che possono verificarsi nelle vie aeree dei pazienti asmatici comprendono aumento della fragilità epiteliale, aumento del danno epiteliale, cambiamenti nella composizione delle glicoproteine della matrice extracellulare e alterazioni morfologiche e funzionali della rete neurale bronchiale [31;32]. La causa del rimodellamento è stata attribuita al ripetuto insulto alle vie aeree proveniente dal continuo ripetersi in maniera ciclica di infiammazione e riparo. Tuttavia gli eventi che portano ad un cronico rimodellamento delle vie aeree sono scarsamente conosciuti. I dati disponibili suggeriscono che citochine fibrogeniche come la famiglia dei fattori di trasformazione-beta (TGF- β) possa giocare un ruolo fondamentale in tale evento. Il TGF- β rappresenta un importante fattore pro-fibrotico nonché un'importante citochina anti-infiammatoria che stimola i fibroblasti a promuovere la sintesi e la secrezione di proteine della matrice extracellulare (ECM). Inoltre è in grado di inibire la sintesi di enzimi deputati alla degradazione della ECM come metalloproteasi (MMPs) e aumenta la produzione di enzimi in grado di inibire tale enzima come l'inibitore tissutale delle metalloproteasi (TIMP-1). Nel BAL di pazienti asmatici sono state trovate aumentate quantità di TGF- β e l'espressione di TGF- β_1 correla con l'ispessimento della membrana basale e con il numero di fibroblasti [33]. Le MMPs sono prodotte da cellule strutturali epiteliali quali fibroblasti e cellule endoteliali e da cellule infiammatorie quali macrofagi, neutrofili ed eosinofili. La produzione di MMPs è soggetta a stretti controlli assicurando in tal modo una limitata proteolisi della ECM durante il rimodellamento e la riparazione tissutale. Vi sono evidenze a supporto di uno squilibrio tra MMPs e TIMPs nelle vie aeree di pazienti asmatici con un ridotto rapporto MMP-9/TIMP-1 rispetto a controlli non asmatici [34].

1.4 Diagnosi di asma

La diagnosi di asma bronchiale viene posta in presenza di sintomatologia caratteristica (es. respiro sibilante, tosse stizzosa ricorrente, dispnea e sensazione di oppressione toracica) e di una storia anamnestica remota suggestiva. Mediante l'utilizzo della spirometria si va a valutare l'ostruzione bronchiale. La spirometria è utile anche per valutare la presenza di iperreattività bronchiale in seguito a diversi tipi di stimoli (in genere farmacologici, ad esempio metacolina o istamina). La misurazione quotidiana della capacità del proprio respiro, che il paziente asmatico può eseguire a domicilio in modo semplice mediante un misuratore del picco di flusso espiratorio, è un metodo per monitorare l'andamento e le variazioni dell'ostruzione bronchiale.

CAPITOLO 2

La Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva: dalla patogenesi alla diagnosi

2.1 Definizione ed epidemiologia della BPCO

Come indicato dalle linee guida Global Initiative For Chronic Obstructive Pulmonary disease (GOLD), la Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) è una malattia prevenibile e trattabile con significativi effetti extra-polmonari che possono contribuire alla gravità della malattia nei singoli pazienti. La sua componente polmonare è caratterizzata da una limitazione al flusso aereo che non è completamente reversibile, è generalmente progressiva e associata ad una risposta infiammatoria polmonare anomala a particelle nocive o gas.

La cronica limitazione al flusso aereo, caratteristica della BPCO, è causata in parte dalle alterazioni a carico delle piccole vie aeree (bronchiolite ostruttiva) ed in parte dalla distruzione parenchimale (enfisema); il contributo di ciascuna di queste due componenti varia da un individuo all'altro.

L'ostruzione, il rimodellamento delle vie aeree periferiche e l'enfisema sono dovuti ad una abnorme risposta infiammatoria delle vie aeree e del parenchima polmonare all'inalazione del fumo di sigaretta e di altri inquinanti.

La BPCO è una patologia respiratoria, ma è variabilmente associata a significativi effetti extrapolmonari e comorbidità, che sono la causa principale di morte in questi pazienti [35].

I meccanismi alla base di queste comorbidità sono due:

- da un lato ci sono comorbidità con-causali, cioè legate a fattori di rischio condivisi con la BPCO (ad es. la cardiopatia ischemica, l'ipertensione, il diabete, che condividono con la BPCO il fumo di sigaretta);
- dall'altro ci sono comorbidità complicanti, cioè dovute ad effetti extrapolmonari della BPCO:
 - *alterazioni nutrizionali e perdita di peso* per aumento della spesa energetica a riposo;
 - *perdita della massa muscolare* per la flogosi cronica sistemica, per l'ipossia tissutale cronica e la vita sedentaria;
 - *osteopenia, osteoporosi e anemia normocromica normocitica* per l'infiammazione sistemica cronica;
 - *deficit cognitivi e disturbi dell'umore* per l'ipossia cerebrale cronica e la limitazione della vita sociale e affettiva [36, 37].

La broncopneumopatia cronica ostruttiva colpisce tutte le popolazioni, ma è maggiore nei

Paesi industrializzati rispetto a quelli in via di sviluppo, per il più elevato livello di inquinamento atmosferico. È in continuo aumento nei Paesi industrializzati.

Interessa entrambi i sessi ed è in aumento soprattutto nel sesso femminile, per la maggiore diffusione dell'abitudine al fumo nelle donne.

Aumenta con l'età ma non è una malattia delle persone con più di 50 anni; infatti il 10% dei soggetti tra i 20 e i 44 anni presenta tosse con espettorato, senza segni di ostruzione bronchiale e il 3,6% sintomi di ostruzione bronchiale.

Il 4-6% degli adulti europei e più del 50% dei maschi fumatori, di età superiore ai 60 anni, soffre di BPCO clinicamente evidente [35].

La morbilità è prevista in notevole aumento, con uno spostamento dal dodicesimo al sesto posto. In termini di ricoveri ospedalieri in Italia, i casi di BPCO risultano al settimo posto.

La BPCO è la quarta causa di morte negli Stati Uniti (dopo cardiopatie, neoplasie e malattie cerebrovascolari) e la quinta nel mondo. La dimensione della malattia crescerà enormemente, quando si manifesteranno le conseguenze dell'abitudine al fumo di tabacco nei Paesi in via di sviluppo. La BPCO ha un forte impatto economico e sociale.

Da un punto di vista sociale, è una delle prime cause di disabilità insieme alla cardiopatia ischemica, alla depressione grave, agli incidenti stradali e alle vasculopatie cerebrali. Nel 1990 la BPCO era la 12° delle principali cause di DALY (anni di vita persi a causa della disabilità) persi nel mondo. In base alle proiezioni, nel 2020 la BPCO sarà la 5° causa di DALY persi nel mondo.

Da un punto di vista economico, nell'Unione Europea, la BPCO è responsabile del 56% delle spese per malattie respiratorie, che ammontano al 6% circa delle spese totali per l'assistenza sanitaria [38].

2.2 Etiologia e patogenesi della BPCO

La broncopneumopatia cronica ostruttiva è il risultato dell'interazione tra fattori individuali ed agenti ambientali. Infatti, non tutti i soggetti fumatori sviluppano la patologia e non meno del 20% dei casi si verifica in non fumatori: questo sottolinea l'importanza della predisposizione individuale, da un lato, e di altri fattori di rischio, oltre al fumo di sigaretta, dall'altro.

Ruolo dei fattori individuali:

Il meglio documentato è il **deficit ereditario severo di alfa1-antitripsina** (α 1-AT). L'alfa1-antitripsina è una glicoproteina ad attività antiproteasica prodotta dal fegato e immessa in circolo. Si lega e inattiva gli enzimi proteolitici dei macrofagi e dei polimorfonucleati, limitando così il danno secondario alla loro liberazione nell'ambiente alveolare [37].

L' α 1-antitripsina è soggetta ad un polimorfismo genetico: il genotipo omozigote per il gene M è il più diffuso nella popolazione e determina livelli normali di α 1-AT; i genotipi omozigoti SS e ZZ si associano a livelli progressivamente minori di α 1-AT e questo comporta un rischio elevato di sviluppo di enfisema polmonare (i portatori del genotipo omozigote ZZ costituiscono lo 0,1% della popolazione).

I genotipi eterozigoti MS e MZ sono caratterizzati da un grado intermedio di deficienza di α 1-AT e non sviluppano l'enfisema se non si espongono ad altre noxae lesive esogene [36]

Ruolo dei fattori ambientali:

Il più importante è il **fumo di sigaretta**. Esiste una relazione causale tra fumo attivo e morbilità e mortalità per BPCO e quindi l'eliminazione del fumo può largamente prevenire la malattia. Circa il 40-50% dei fumatori sviluppa la BPCO. Il rischio di contrarre la malattia e di morte per BPCO aumenta con il numero di sigarette fumate e si riduce con la cessazione dell'abitudine al fumo [39].

Il soggetto con BPCO che continua a fumare ha una prognosi peggiore del soggetto che sospende l'abitudine tabagica e, maggiore è il numero delle sigarette fumate, maggiore è la velocità di declino della funzione polmonare. Inoltre, il rischio di BPCO aumenta anche con l'esposizione al fumo passivo, specialmente per i partners e per i figli dei fumatori [40].

In Italia, la prevalenza dei fumatori, stimata nel 2009, è di 13 milioni di persone. La fascia d'età a maggiore prevalenza è quella tra i 25 e i 44 anni (32%) mentre tra i 15 e i 24 anni e tra i 45 e i 64 anni la prevalenza è del 29%. C'è stato un incremento dell'abitudine tabagica dal 2008 al 2009 di circa 2 milioni di persone. Questo è legato a due fattori:

- l'aumento dei fumatori nei giovani (2008: 24%; 2009: 29%);

- la riduzione degli ex-fumatori (2008: 18,4%; 2009: 14,6%) [35].

Il fumo esercita una serie di effetti negativi sull'apparato respiratorio, che sono alla base dello sviluppo della BPCO:

- stimola la secrezione mucosa, attraverso l'induzione dell'iperplasia delle ghiandole sottomucose e l'aumento del numero delle cellule caliciformi mucipare;
- induce flogosi a carico delle vie aeree, con richiamo di macrofagi e neutrofilo e rilascio di enzimi proteolitici, radicali dell'ossigeno e mediatori lesivi;
- inattiva le antiproteasi polmonari e quindi favorisce lo sviluppo dell'enfisema;
- altera l'efficienza della clearance muco-cigliare, con conseguente ristagno delle secrezioni nel lume delle vie aeree e facilitazione alle infezioni [36].

Altrettanto importanti sono i **fattori professionali**, responsabili del 30% dei casi di BPCO nei soggetti non fumatori [35].

Le principali attività lavorative coinvolte sono:

- la lavorazione di materie plastiche, tessili, gomma e pelli;
- l'attività edile ed estrattiva;
- l'industria alimentare;
- l'attività agricola di allevamento di animali.

Altri fattori di rischio esogeni implicati sono:

- **l'inquinamento outdoor**: indubbiamente fumi, gas, vapori, connessi con l'inquinamento urbano, possono esercitare un effetto lesivo sulle vie aeree, però non è stata dimostrata una relazione causale tra l'inquinamento outdoor e la BPCO in assenza di fattori lesivi maggiori (ad es. il fumo) [36];
- **l'inquinamento indoor**: il fumo da combustibili vegetali, animali, carbone, in ambienti con scarsa ventilazione, soprattutto nei Paesi a basso livello di sviluppo economico, è un fattore di rischio per la BPCO;
- **lo stato socio-economico**: c'è un rapporto inversamente proporzionale tra BPCO e stato socio-economico. Probabilmente questo dipende dal fatto che il basso stato socio-economico si associa all'abitudine tabagica, all'inquinamento indoor e outdoor, alla malnutrizione;
- **le infezioni**: una storia di severe infezioni respiratorie nell'infanzia è associata con la riduzione della funzione polmonare e con l'aumento dei sintomi respiratori nell'adulto. Tuttavia, la suscettibilità alle infezioni virali può essere correlata ad un altro fattore (come il basso peso alla nascita), che anch'esso è correlato alla BPCO [38].

2.3 Fisiopatologia ed anatomia patologica

L'infiammazione cronica dell'albero respiratorio è l'elemento patogenetico chiave della BPCO ed è un'amplificazione della risposta infiammatoria normale ad agenti irritativi cronici [38]. La risposta infiammatoria, presente a livello delle vie aeree distali, correla con i livelli di severità della malattia [41].

Nella mucosa bronchiale di un fumatore cronico si creano aree più o meno estese di metaplasia squamosa dell'epitelio e si osserva una marcata ipertrofia dell'apparato ghiandolare mucosecernente, che è alla base dell'ipersecrezione mucosa caratteristica della malattia.

All'aumentata produzione di muco si associa, però, una menomazione delle strutture deputate alla sua espulsione (le ciglia vibratili appaiono, infatti, più corte e meno mobili del normale).

L'ipersecrezione mucosa, che determina la comparsa di tosse cronica produttiva, è un aspetto tipico della bronchite cronica e non è necessariamente associato alla limitazione del flusso aereo. D'altro canto, non tutti i pazienti con BPCO mostrano un'ipersecrezione mucosa sintomatica. Quando presente essa deriva dalla metaplasia mucosa associata all'aumento del numero delle cellule caliciformi ed all'incremento delle dimensioni delle ghiandole sottomucose in risposta all'irritazione cronica delle vie aeree da parte del fumo di sigaretta o di altri agenti nocivi [35]. Numerosi mediatori e proteasi stimolano l'ipersecrezione mucosa e molti di questi esercitano il loro effetto mediante l'attivazione dell' Epidermal growth factor receptor (EGFR) [42].

Si ha, inoltre, un infiltrato infiammatorio cronico nella mucosa bronchiale, costituito prevalentemente da macrofagi e linfociti T CD8+.

Un quarto elemento è lo spasmo della muscolatura liscia bronchiale, per stimolazione delle terminazioni nervose sensitive sottomucose, in seguito alle alterazioni della mucosa respiratoria [37].

Il rimodellamento della parete bronchiale, quindi, insieme all'accumulo di essudato nel lume, determina un aumento delle resistenze e la riduzione del flusso aereo [35].

I neutrofilii e i macrofagi, attivati dal fumo, producono proteasi, che danneggiano le cellule polmonari e, insieme ai linfociti T CD8+ che liberano tumor necrosis factor alpha (TNF- α), perforine e provocano apoptosi delle cellule alveolari, giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'enfisema [43, 44].

L'enfisema polmonare consiste in un aumento di volume permanente degli spazi aerei distali ai bronchioli terminali, associato a distruzione delle loro pareti [37]. Questo comporta la riduzione del ritorno elastico e quindi contribuisce alla riduzione del flusso aereo [35].

La forma di enfisema più comune nei fumatori è quella centroacinare, dove sono colpite le parti centrali dell'acino, mentre le parti periferiche rimangono indenni. La forma associata invece al deficit di $\alpha 1$ -AT è l'enfisema panacinare, che interessa ugualmente le parti centrali e periferiche del lobulo [37].

Il rimodellamento bronchiale, da un lato, e l'enfisema, dall'altro, determinano un'ostruzione cronica al flusso aereo e quindi un'iperinsufflazione polmonare, per l'intrappolamento dell'aria durante l'espiazione. L'iperinsufflazione è il meccanismo principale della dispnea da sforzo, attraverso l'aumento della capacità funzionale residua (CFR) e, quindi, una riduzione della riserva inspiratoria [45].

La riduzione della superficie alveolo-capillare, conseguente all'enfisema, comporta una riduzione della diffusione dei gas (maggiore per l'ossigeno rispetto all'anidride carbonica), con conseguente ipossiemia e, se la ventilazione non viene congruamente aumentata, ipercapnia.

Inoltre, soprattutto nell'enfisema centroacinare, dove si ha un danno maggiore a carico della componente ventilatoria, mentre quella circolatoria è relativamente risparmiata, perchè è prevalentemente rappresentata alla periferia dell'acino, si verifica uno squilibrio ventilazione-perfusione, con aumento dello spazio morto alveolare e, quindi, ipossiemia [37].

L'ipossiemia è il principale fattore responsabile di una grave complicanza della BPCO, cioè l'ipertensione polmonare cronica. L'ipossiemia, infatti, determina vasocostrizione ipossica delle arteriole polmonari e quindi ipertensione, inizialmente reversibile, che poi evolve in ipertensione cronica, per cambiamenti strutturali della parete arteriosa, ovvero iperplasia intimale e ipertrofia-iperplasia della muscolatura liscia [46].

Questo è favorito anche dalla riduzione del letto vascolare polmonare provocata dall'enfisema e dallo sviluppo, a livello arteriolare, di una risposta infiammatoria simile a quella delle vie respiratorie [35].

Le alterazioni anatomo-patologiche nella BPCO interessano vari distretti delle vie aeree:

- Vie aeree prossimali (trachea, bronchi con diametro > 2mm): cellule infiammatorie (aumento di macrofagi e linfociti T CD-8), alterazioni strutturali (aumento delle cellule caliciformi, ingrandimento delle ghiandole sottomucose).
- Vie aeree periferiche: cellule infiammatorie (aumento macrofagi, linfociti T CD-8, linfociti B, follicoli linfoidi, fibroblasti), alterazioni strutturali (ispessimento della parete delle vie aeree, fibrosi peribronchiale, essudato infiammatorio luminale, restringimento delle vie aeree)
- Parenchima polmonare: cellule infiammatorie (aumento di macrofagi e linfociti CD-8),

alterazioni strutturali (distruzione della parete alveolare, apoptosi delle cellule epiteliali e endoteliali, enfisema centrolobulare/ panacinare).

- Vasi polmonari: cellule infiammatorie (aumento macrofagi e dei linfociti T), alterazioni strutturali (ispessimento dell'intima, disfunzione delle cellule endoteliali, aumento della muscolatura liscia).

L'estensione del processo infiammatorio, della fibrosi e dell'essudato endoluminale nelle piccole vie aeree correla con la riduzione del FEV1 e del rapporto FEV1/FVC e probabilmente con il declino accelerato del FEV1 caratteristico della malattia [47].

In genere l'infiammazione e le alterazioni strutturali delle vie aeree aumentano con la gravità della malattia [47] e persistono anche dopo la cessazione del fumo.

L'infiammazione dell'albero respiratorio nei pazienti con BPCO appare un'amplificazione della risposta infiammatoria normale ad agenti irritanti cronici come il fumo di sigaretta. Il meccanismo alla base di tale amplificazione non è ancora noto ma si presume che sia geneticamente determinato. Tuttavia, una piccola percentuale di pazienti, pur in assenza di fattori genetici noti, sviluppa BPCO senza aver mai fumato. La causa scatenante della risposta infiammatoria in questi casi non è ancora conosciuta [48, 49]. L'ipotesi più accreditata ed avallata da numerosi studi si basa sul fatto che le cellule infiammatorie attivate dal fumo di sigaretta rilascino proteasi che possano distruggere il parenchima polmonare. In particolare i neutrofili ed i macrofagi, che sono attivati dal fumo di sigaretta, possono produrre proteasi come l'elastasi leucocitica e le metallo proteasi che danneggiano le cellule polmonari e l'interstizio [50]. Comunque anche i linfociti giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'enfisema. Si è infatti visto in vivo che la distruzione del parenchima si associa ad un processo flogistico a livello alveolare mediato principalmente dai linfociti T. I linfociti T CD8 possono danneggiare il parenchima polmonare sia direttamente rilasciando TNF-alfa e perforine sia indirettamente promuovendo l'apoptosi delle cellule alveolari [51-53].

La BCPO è una malattia progressiva che in alcuni casi può diventare anche estremamente severa. La risposta infiammatoria presente a livello delle vie aeree distali correla con i livelli di severità [47]. Ovvero maggiore è la severità e più intensa è la risposta infiammatoria. Tali dati documentano come la risposta flogistica giochi un ruolo fondamentale nella progressione della malattia.

2.4 Diagnosi

La BPCO è una malattia progressiva, ma l'evoluzione è molto variabile tra gli individui affetti.

I segni e sintomi comuni a tutti i pazienti con BPCO sono la tosse produttiva con espettorazione mucosa o muco-purulenta e la dispnea; tuttavia, l'importanza relativa di questi sintomi può essere molto diversa da paziente a paziente, in base alla prevalenza dei disordini di tipo flogistico-ipersecretivo o di quelli ostruttivi [36].

Si distinguono, in particolare, due quadri tipici, A e B, che rappresentano gli estremi di un'ampia gamma di quadri con caratteristiche intermedie.

Nel tipo A ("pink puffer") prevale la componente enfisematosa, il sintomo dominante è la dispnea da sforzo, mentre la tosse e l'ipersecrezione sono modeste; questi soggetti, in genere, non vanno incontro alle crisi di insufficienza respiratoria globale da ipoventilazione, in occasione delle riacutizzazioni.

Nel tipo B ("blue and bloated") prevale la componente flogistico-ipersecretiva su quella dispnoica; questi soggetti sono spesso cianotici e frequentemente sviluppano cuore polmonare cronico e insufficienza cardiaca destra [36].

Alcuni individui mostrano un rapido ed accelerato declino della funzione polmonare, mentre in altri c'è una progressione più lenta.

La diagnosi di broncopneumopatia cronica ostruttiva si basa su un'anamnesi positiva per fattori di rischio (primo fra tutti il fumo di sigaretta) e sulla documentazione di un'ostruzione irreversibile al flusso aereo, in presenza o meno di sintomi, dopo aver escluso altre cause di broncoostruzione cronica. La spirometria è il gold standard per la diagnosi e la stadiazione della BPCO.

È importante sottolineare che, l'arresto dell'esposizione ad agenti nocivi, implicati nella BPCO, può controllare i sintomi e migliorare la qualità della vita. Tuttavia, una volta sviluppata, la BPCO non può essere guarita [39].

I principali predittori della sopravvivenza, nello stadio terminale della BPCO, sono: la persistenza dell'abitudine tabagica, la presenza di comorbidità, la grave ipossiemia e un BMI inferiore a 25 [54, 55].

CAPITOLO 3

Riacutizzazioni

3.1 Riacutizzazioni di BPCO

Negli ultimi anni, grazie anche alla messa a punto di metodiche di biologia molecolare sempre più sensibili, c'è stata una rivalutazione del ruolo delle infezioni nella BPCO e attualmente vi è una chiara evidenza che le infezioni, sia batteriche che virali, rappresentino non solo la causa principale delle riacutizzazioni, ma contribuiscano anche alla patogenesi della malattia [56].

3.1.1 Fasi di riacutizzazione

Le riacutizzazioni della BPCO sono eventi relativamente frequenti che hanno un grande impatto sul benessere del paziente, sia a breve che a lungo termine. Influiscono negativamente sulla storia naturale della malattia, infatti il declino della funzione polmonare è accelerato nei pazienti con frequenti riacutizzazioni. Uno studio recente ha mostrato che più severa è la malattia maggiore è il numero di pazienti che manifesta frequenti riacutizzazioni. Tuttavia lo stesso studio ha dimostrato che anche una percentuale significativa di pazienti con malattia più lieve manifesta frequenti riacutizzazioni. Lo studio ha quindi descritto il cosiddetto fenotipo di BPCO con frequenti riacutizzazioni ovvero pazienti che manifestano frequenti riacutizzazioni indipendentemente dalla gravità della malattia. Tale fenotipo si mantiene costante nel tempo [57].

Secondo le linee guida GOLD, si definisce la riacutizzazione come “un evento, nella storia naturale della malattia, caratterizzato da un cambiamento nei sintomi di base del paziente, cioè dispnea, tosse e/o espettorazione, oltre le normali variazioni giornaliere, ad esordio acuto, che può giustificare una modificazione della regolare terapia di base del paziente”.

La frequenza delle riacutizzazioni varia da uno a quattro casi per persona per anno e generalmente aumenta con la progressione della malattia. La frequenza dell'ospedalizzazione per riacutizzazione varia da 0,15 a 0,25 per paziente per anno e la durata della degenza, in media, è di 8,7 giorni. La presenza di comorbidità (insufficienza cardiaca, cardiopatia ischemica o diabete mellito) è il più importante fattore predittivo per l'ospedalizzazione a causa di riacutizzazione di BPCO. Il ricovero per riacutizzazione di BPCO è associato ad una mortalità che va dal 2,5 al 24% e che supera il 43% in chi necessita della ventilazione meccanica. La mortalità è inoltre elevata in soggetti in età avanzata, di sesso maschile, con

ridotta funzione polmonare e comorbidità [58]. In corso di riacutizzazione si ha anche un aumento dell'iperinsufflazione e dell'intrappolamento d'aria con riduzione del flusso espiratorio che spiegano l'aggravamento della dispnea. Si assiste anche ad un peggioramento delle alterazioni del rapporto Va/Q che determina ipossiemia grave.

Il 75-80% delle riacutizzazioni sono causate da infezioni virali e/o batteriche; di queste il 50% è causata da batteri, il 30% da virus ed il restante 20% da un'associazione dei due. Il 20-25% delle riacutizzazioni sono invece probabilmente da imputare all'inquinamento e ad altre condizioni ambientali [57].

Le tre principali specie batteriche isolate in corso di riacutizzazione sono: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae*. Altri potenziali patogeni, isolati meno frequentemente, sono: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus parainfluenzae* e *Hemophilus hemolyticus* [59].

I principali virus associati con le riacutizzazioni della BPCO sono: Rhinovirus, Coronavirus, Influenza A e B, Adenovirus e Virus Respiratorio Sinciziale [60].

3.1.2 Infiammazione in corso di riacutizzazione

Numerosi studi documentano che le riacutizzazioni nella BPCO sono caratterizzate da un aumento della preesistente infiammazione a carico delle vie aeree associate [61]. Tuttavia per quanto riguarda i markers infiammatori e le cellule coinvolte in tali processi vi sono pochi dati perché è difficile prelevare materiale biologico (espettorato, biopsie bronchiali, lavaggio bronco alveolare) in un paziente in fase di riacutizzazione.

Il ruolo degli eosinofili è controverso anche in corso di riacutizzazione. Infatti, in alcuni studi si è evidenziato un aumento degli eosinofili in corso di riacutizzazione [62, 63] mentre in altri non si è visto un tale aumento nella conta cellulare [61]. Queste discrepanze possono essere almeno in parte giustificate dal fatto che i pazienti sono stati seguiti in modo differente e avevano grado diverso di ostruzione.

E' interessante sottolineare che uno studio ha dimostrato che l'aumento di eosinofili in corso di riacutizzazione di BPCO si ha solo in presenza di infezione virale delle vie aeree [64]. Pertanto ciò potrebbe rappresentare un marcatore specifico di infezione virale. Un altro studio ha documentato che in corso di riacutizzazione si assiste ad un aumento di linfociti T a fenotipo Th2, ovvero in grado di produrre IL-4 ed IL-5. Essendo gli eosinofili le molecole effettrici della cascata infiammatoria Th2, l'aumento delle cellule Th2 potrebbe giustificare l'incremento di eosinofili che si verifica in alcuni casi di BPCO riacutizzata [65].

E' stato descritto in corso di riacutizzazioni anche un aumento di neutrofili e linfociti T [66]. Alcuni studi mostrano anche una correlazione tra la frequenza delle riacutizzazioni e il pattern di citochine presenti nello sputo. Pazienti che hanno frequenti riacutizzazioni hanno nello sputo più alti livelli di IL-6 e di IL-8 rispetto a quelli che hanno rare riacutizzazioni [66].

Molti markers sono aumentati in corso delle riacutizzazioni di BPCO: citochine, IL-6, IL-8, endotelina, LTB4 [61, 67]. Si è anche visto che i livelli di IL-6 sono più alti quando la riacutizzazione è associata ai sintomi del comune raffreddore [61].

In corso di riacutizzazione si ha anche un aumento dei livelli di isoprostano non solo nel BAL ma anche a livello urinario [68]. La secrezione urinaria di isoprostano torna poi nella norma a seguito del trattamento che viene effettuato nei pazienti con BPCO riacutizzata.

Nei pazienti con riacutizzazioni secondarie a infezioni delle vie aeree, anche se queste non hanno eziologia batterica, si ha un aumento plasmatico della proteina C reattiva che si normalizza, come nel caso dell'isoprostano, a seguito del trattamento [69].

Comunque c'è grande variabilità nell'espressione dei markers infiammatori nell'ambito delle riacutizzazioni e ciò suggerisce eterogeneità della risposta infiammatoria in tali casi.

3.1.3 Il ruolo dei batteri nella malattia in fase di stabilità

La presenza di microrganismi batterici patogeni, nelle vie aeree dei pazienti con BPCO stabile, è molto comune e si rileva nel 25-50% dei soggetti, in contrasto con la sterilità delle vie aeree del polmone sano.

Uno studio ha evidenziato che, all'aumentare della carica batterica nelle vie aeree, cresce il grado d'infiammazione e a questo si associa un più rapido declino del FEV1 e, quindi, un più veloce peggioramento del grado di ostruzione al flusso aereo [70]. Di conseguenza, la colonizzazione batterica nella malattia in fase di stabilità è un importante fattore nella sua progressione.

Il fatto che ci sia una relazione direttamente proporzionale tra la carica batterica nelle vie aeree e il grado d'infiammazione delle stesse è stato sottolineato da diversi studi.

In particolare, si è visto che i livelli di TNF- α , IL-8, mieloperossidasi ed elastasi neutrofila nell'espettorato sono elevati nei pazienti che risultano colonizzati da batteri patogeni [71]. L'IL-8 e i neutrofili giocano un ruolo chiave nello sviluppo della BPCO: sono entrambi associati all'enfisema ed al peggioramento dell'ostruzione al flusso aereo.

Altre evidenze della cronica colonizzazione batterica nella BPCO sono: la presenza di follicoli linfoidi, ricchi di linfociti B, nelle piccole vie aeree (probabilmente rappresentano una risposta tissutale all'infezione cronica locale) e la presenza di bronchiectasie nella

malattia avanzata, rilevate con tomografia computerizzata ad alta risoluzione (HRTC) [56].

Un ruolo fondamentale nello sviluppo di una colonizzazione microbica cronica nei pazienti con BPCO è svolto dalla grave compromissione delle difese immunitarie innate dell'apparato respiratorio, determinata, perlomeno inizialmente, dal fumo di tabacco. Infatti, si osserva una riduzione della clearance muco-cigliare, un'iporesponsività e riduzione della capacità fagocitica dei macrofagi alveolari, una riduzione dell'espressione sulla membrana macrofagica e delle cellule epiteliali bronchiali di recettori toll-like. Il fallimento dell'immunità innata permette lo sviluppo dell'infezione nelle basse vie aeree. A sua volta, i microrganismi patogeni contribuiscono alla distruzione dell'immunità stessa, attraverso il danno dell'epitelio bronchiale e delle ciglia vibratili, perpetuando l'infezione e creando un vero e proprio circolo vizioso, come schematizzato nella Figura 3 [56].

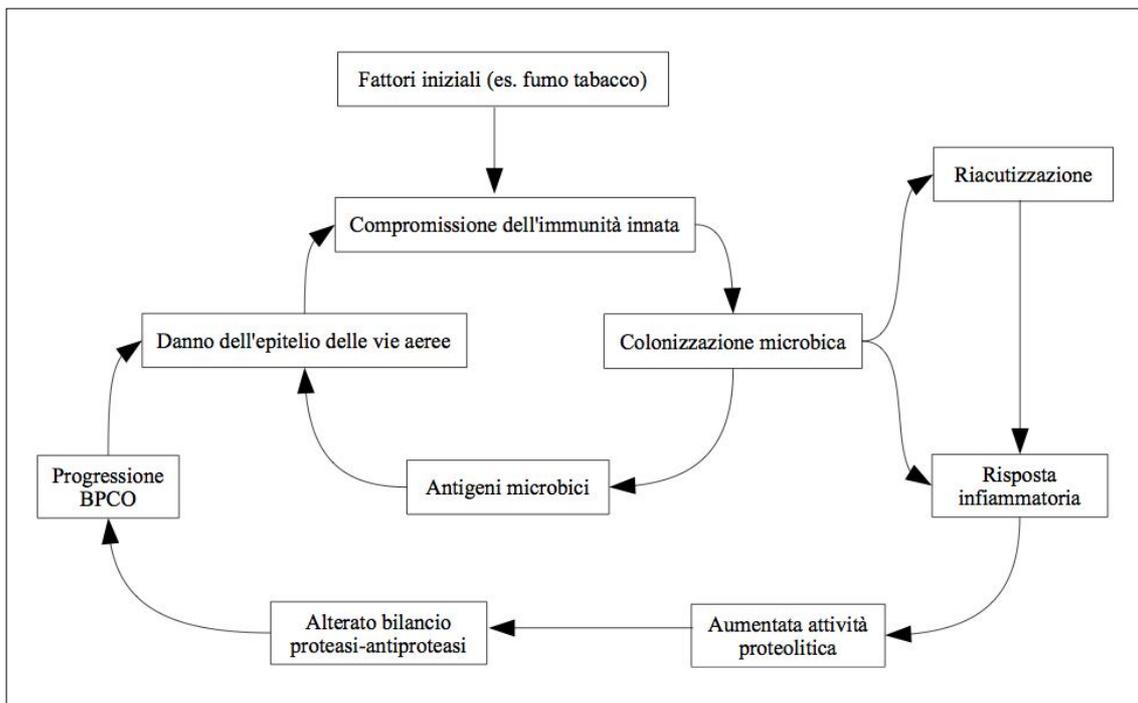


Figura 3: L'ipotesi del circolo vizioso alla base dell'infiammazione persistente e delle infezioni, caratteristiche della BPCO (modificata da "Sanjay Sethi M. D. and Timothy F. Murphy M. D. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease").

L'esistenza di questo circolo vizioso pone le basi per future nuove possibilità di trattamento della BPCO, basate, per esempio, sulla modulazione della risposta immunitaria innata e sull'azione specifica verso determinati agenti microbici per cercare di rallentare l'evoluzione della malattia.

3.1.4 Il ruolo dei virus nella malattia in fase di stabilità

I virus respiratori sono stati rilevati nei pazienti con BPCO in fase di stabilità, suggerendo che essi svolgano un ruolo, insieme ai microrganismi batterici, nella patogenesi della malattia stabile.

Il virus più frequentemente isolato nella BPCO in fase di stabilità è il Virus Respiratorio Sinciziale (RSV), un virus a RNA che infetta le cellule epiteliali bronchiali attraverso la fusione della superficie delle stesse cellule.

La presenza di un'infezione virale cronica, nelle vie aeree dei pazienti con BPCO, gioca un ruolo chiave nell'induzione di un'inflammatione cronica, costituita prevalentemente da linfociti T CD8+, che contribuisce al danno polmonare associato alla progressione della malattia.

Questo è sostenuto dall'osservazione che i pazienti, nei quali è stata rilevata la presenza del RSV nell'espettorato, ripetutamente, per oltre due anni, hanno un più rapido declino della funzione respiratoria.

Un ruolo importante, nella patogenesi della malattia in fase di stabilità, è svolto anche dall'infezione latente da Adenovirus. Durante l'infezione latente, vengono prodotte le proteine virali che determinano la persistenza di un'inflammatione cronica, costituita soprattutto da linfociti T CD8 +, ma il virus non replica completamente [60].

3.1.5 I batteri come causa di riacutizzazione della BPCO

L'isolamento dall'espettorato di un batterio potenzialmente patogeno ha la stessa incidenza durante le riacutizzazioni e durante la fase stabile della malattia. Quindi, non è sufficiente la presenza di un batterio patogeno nelle vie aeree inferiori per spiegare le riacutizzazioni di natura infettiva batterica. È stato allora proposto che la riacutizzazione potesse derivare da un aumento della carica batterica, ovvero della concentrazione dei batteri che normalmente colonizzano le vie aeree nella BPCO stabile. Ma anche questo non si è dimostrato sufficiente per spiegare lo sviluppo delle riacutizzazioni [59]. Un nuovo modello per cercare di spiegare la patogenesi delle riacutizzazioni su base batterica è quello che ritiene che giochi un ruolo centrale l'acquisizione di nuovi ceppi di *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* [57]. In assenza della malattia polmonare, questi patogeni colonizzano il tratto respiratorio superiore; nei pazienti con BPCO infettano, invece, sia il tratto respiratorio superiore che inferiore e causano, a volte, un'infezione sistemica. Non sempre, però, l'acquisizione di un nuovo ceppo batterico è associata ad una riacutizzazione. Questo dipende dal bilancio tra la capacità di difesa dell'ospite e la virulenza del patogeno, con conseguenti diversi livelli d'inflammatione

delle vie aeree e, quindi, diversa gravità dei sintomi lamentati dal paziente [59]. Se la risposta immunitaria specifica secondaria all'infezione è adeguata, eventualmente in associazione alla terapia antibiotica, si avrà l'eliminazione del ceppo batterico e, quindi, la "guarigione", altrimenti si potrà instaurare un'infezione persistente. Nuove riacutizzazioni potranno derivare dall'infezione da parte di nuovi ceppi, anche dello stesso patogeno, verso i quali il paziente è suscettibile; vedi schema in Figura 2 [59]. Con il peggioramento della malattia aumenta la frequenza delle riacutizzazioni, soprattutto di quelle batteriche sostenute da patogeni opportunistici gram negativi (ad esempio lo *Pseudomonas aeruginosa*), probabilmente per una progressiva riduzione dell'immunità innata ed adattativa a livello polmonare [60].

Ogni microrganismo batterico provoca un proprio pattern infiammatorio, ma in generale le infezioni batteriche determinano un'ipersecrezione mucosa, la riduzione del battito cigliare e la chemiotassi prevalentemente neutrofila, attraverso l'induzione di citochine come IL-6, IL-8 e TNF- α . La degranolazione dei neutrofili attivati comporta il rilascio di elastasi, proteasi ed agenti ossidanti. Le proteasi e gli agenti ossidanti danneggiano l'epitelio delle vie aeree, riducono la frequenza del battito cigliare, stimolano la secrezione mucosa ed aumentano la permeabilità della mucosa bronchiale. Questo determina, soprattutto a livello delle vie aeree più distali, un aumento dell'ostruzione al flusso aereo (con conseguente peggioramento della dispnea), e un aumento dell'espettorato di natura purulenta. L'elastasi neutrofila, che raggiunge alti livelli durante le riacutizzazioni batteriche, contribuisce significativamente al danno polmonare e alla perdita della funzione respiratoria, tipica dell'evoluzione della BPCO. Alla cascata infiammatoria che caratterizza le riacutizzazioni della malattia, contribuiscono anche componenti batterici (come il lipopolisaccaride), attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare KB e la produzione di citochine, chemochine e molecole d'adesione [72].

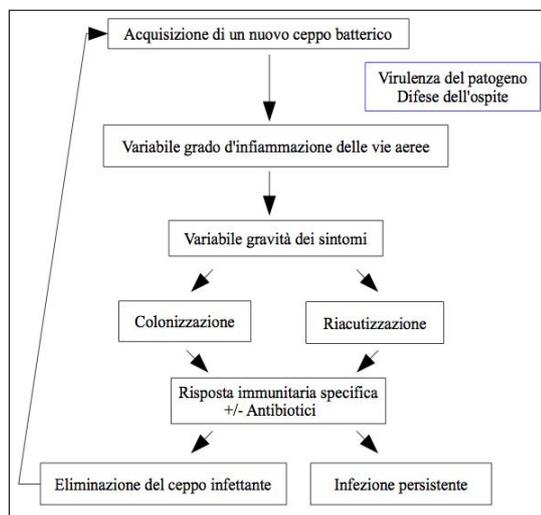


Figura 2: Modello proposto per spiegare le riacutizzazioni batteriche nella BPCO (modificata da "Sanjay Sethi M. D. and Timothy F. Murphy M. D. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease").

3.1.6 I virus come causa di riacutizzazione della BPCO

Anche i virus sono una causa rilevante di riacutizzazione della malattia e sono associati a riacutizzazioni severe, che richiedono spesso l'intubazione e la ventilazione meccanica del paziente. I virus respiratori sono stati anche riscontrati nella BPCO in fase di stabilità, suggerendo la possibilità di un'infezione virale cronica che può avere un ruolo nell'evoluzione della malattia.

Uno studio ha rilevato, attraverso l'uso della PCR (reazione a catena della polimerasi), in 66 riacutizzazioni ad eziologia virale, i Rhinovirus in 39 casi (59%), il Virus Respiratorio Sinciziale in 19 casi (28,8%), i Coronavirus in 7 casi (10,6%), il Virus dell'Influenza A in 6 casi (9%), il Virus dell'Influenza B in 3 casi (4,5%), il Parainfluenza Virus in 1 caso (1,5%) e gli Adenovirus in 1 caso (1,5%). Questo dimostra che multipli virus possono essere responsabili di una singola riacutizzazione.

I principali fattori che favoriscono le infezioni virali sono: l'infiammazione e la colonizzazione batterica delle vie aeree, il fumo di sigaretta e la stagione dell'anno (le infezioni virali sono, infatti, più frequenti nei mesi invernali, quando le temperature sono più fredde).

I Rhinovirus sono la causa più frequente delle riacutizzazioni ad eziologia virale (sono, infatti, implicati nel 43% di esse). Uno studio ha dimostrato che i pazienti con BPCO sviluppano riacutizzazioni della malattia e raffreddori con una dose di virus 100/1000 volte inferiore a quella necessaria per causare lo stesso effetto su soggetti sani. Inoltre, esiste un intervallo di 3/4 giorni tra il picco dei sintomi del raffreddore e quello dei sintomi legati alla colonizzazione delle vie aeree inferiori, ovvero i sintomi della riacutizzazione della malattia.

I Rhinovirus aderiscono all'epitelio delle vie aeree attraverso la molecola d'adesione intercellulare 1 (ICAM-1) e la loro infezione favorisce l'espressione di questa molecola, ovvero potenzia il loro legame all'epitelio bronchiale e l'invasione dello stesso. L'espressione latente della proteina adenovirale E1A, nelle cellule alveolari, aumenta l'espressione di ICAM-1 e questo può rappresentare un meccanismo per aumentare la suscettibilità alle infezioni da Rhinovirus nei pazienti con BPCO [60].

Uno studio ha dimostrato che, a differenza dei neutrofili, che aumentano nell'espettorato in tutte le riacutizzazioni (virali e batteriche) e sono legati, quindi, più alla severità della riacutizzazione che alla sua eziologia, gli eosinofili sono un buon predittore di una riacutizzazione virale. Infatti, gli eosinofili, a differenza dei neutrofili, sono risultati essere significativamente aumentati, nell'espettorato dei pazienti con BPCO, solo nel caso di una

riacutizzazione di natura virale [72].

Nel corso di una riacutizzazione ad eziologia virale aumentano, sia nelle vie aeree che a livello sistemico, i livelli di endotelina-1, un importante broncocostrittore e vasocostrittore, mediatore pro-infiammatorio e favorente l'ipersecrezione mucosa. Inoltre, nel sangue, aumentano i livelli di fibrinogeno e questo suggerisce una maggiore predisposizione alle complicanze cardio-vascolari in corso di riacutizzazione virale [60].

Queste ricerche hanno, quindi, iniziato ad individuare specifici markers infiammatori che possono essere utilizzati per distinguere la differente eziologia di una riacutizzazione della malattia.

3.1.7 L'interazione tra virus e batteri nelle riacutizzazioni della BPCO

Le riacutizzazioni causate sia da virus che da batteri sono più severe e associate ad un più alto livello di markers infiammatori rispetto a quelle ad eziologia puramente virale o batterica.

I virus incrementano l'aderenza e la capacità d'invasione da parte dei batteri; quest'ultimi, a loro volta, aumentano la suscettibilità alle infezioni virali.

Quindi, attraverso questo meccanismo, una prima infezione può potenziare una seconda e così via, con un effetto moltiplicativo [56].

3.2 Riacutizzazioni di asma bronchiale

L'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree caratterizzata da episodi ricorrenti di peggioramento della dispnea, della tosse, del respiro sibilante e dell'oppressione toracica.

Tali episodi prendono il nome di riacutizzazione e contribuiscono in maniera significativa a peggiorare la morbilità e la mortalità nell'asma bronchiale. Per tali motivi la prevenzione ed il trattamento delle riacutizzazioni rappresenta uno degli outcomes fondamentali nel management dell'asma bronchiale.

I sintomi possono presentarsi singolarmente o in combinazione [73] e si associano ad un deterioramento della funzionalità respiratoria.

Le riacutizzazioni sono un elemento fondamentale che contraddistingue la storia naturale della malattia asmatica causando un aumento del consumo di farmaci antiasmatici, delle visite in pronto soccorso, delle ospedalizzazioni e di eventi fatali. Inoltre la frequenza e l'intensità delle riacutizzazioni condizionano la qualità di vita del paziente asmatico con enormi ripercussioni sociali in termini di perdita di giorni lavorativi, scolastici e di spese sanitarie. Il 50% e oltre delle spese legate alla gestione sanitaria dell'asma sono attribuibili in maniera diretta o indiretta alla gestione e alla risoluzione delle riacutizzazioni [74]. Negli USA ogni anno 2 milioni di visite in pronto soccorso e 500000 ricoveri ospedalieri sono dovuti a riacutizzazioni asmatiche [73]. In Gran Bretagna oltre 17 milioni di giorni lavorativi sono persi ogni anno a causa dell'asma con un costo sociale totale annuo di circa un miliardo di sterline. Il costo medio annuale del trattamento farmacologico aumenta di circa 3.5 volte nei pazienti che manifestano una riacutizzazione [75].

L'insorgenza di una riacutizzazione asmatica è lenta ed il deterioramento sia clinico che funzionale sono progressivi.

In alcuni casi la situazione può invece diventare molto grave in breve tempo. La comparsa di questi episodi è generalmente dovuta all'esposizione ad uno stimolo scatenante come infezioni virali, allergeni, polveri, agenti irritanti, modificazioni di temperatura dell'aria inalata; al mancato controllo farmacologico della patologia o ad entrambi i fattori. Generalmente segnali precoci di riacutizzazione sono una lenta e graduale riduzione dei valori di picco di flusso espiratorio (PEF), un concomitante incremento dei sintomi e dell'utilizzo dei farmaci β 2-agonisti a rapida azione. In particolare, la presenza di asma notturno sembra essere un marker di scarso controllo dell'asma. Per riconoscere precocemente un peggioramento della patologia il monitoraggio dei sintomi e l'eventuale necessità di terapie aggiuntive sono di grande importanza per medico e paziente.

Prevenire, identificare, trattare prontamente le riacutizzazioni sono passi fondamentali nella

gestione a lungo termine dell'asma. Nonostante tutto, non sempre la gravità di un attacco asmatico viene riconosciuta dal medico e questo può comportare un trattamento iniziale inadeguato e magari ad un ritardo nella decisione di ospedalizzazione.

3.2.1 Livelli di gravità delle riacutizzazioni asmatiche

La definizione del livello di gravità di una riacutizzazione è importante, in quanto regola le decisioni terapeutiche. La gravità viene definita secondo parametri clinici che tengono conto della severità dei sintomi, dei valori della frequenza respiratoria e cardiaca, dell'obiettività toracica, della riduzione del PEF e dei valori emogasanalitici [73]. Si attribuisce un livello di gravità maggiore se:

- il paziente non risponde al primo trattamento somministrato;
- l'esordio della riacutizzazione è stato improvviso;
- il quadro clinico e funzionale si è rapidamente aggravato;
- la storia del paziente fa pensare che possa essere a rischio di morte per asma.

I fattori associati ad un aumentato rischio di morte per asma sono: la presenza in anamnesi di ospedalizzazioni per crisi asmatiche nell'anno precedente, soprattutto se si sono resi necessari un trattamento di emergenza e con ventilazione meccanica; un'anamnesi positiva per uso attuale o recente di corticosteroidi sistemici; una scarsa aderenza al programma terapeutico; la presenza di disturbi psichiatrici o di problemi socio-familiari, elementi che destano il sospetto di una non ottimale gestione terapeutica e/o uno scarso riconoscimento dei sintomi e della loro gravità [76, 77].

Uno studio condotto per valutare l'impatto economico dell'asma e della rinite [74] ha evidenziato che più del 70% dei pazienti con asma lieve moderato vanno incontro ad una media di 40 episodi di riacutizzazione lieve l'anno ed il 40% di questi pazienti presentano due riacutizzazioni severe per anno. D'altra parte un altro studio simile evidenzia invece una frequenza molto inferiore di riacutizzazioni [78].

Tra i fattori di rischio dell'asma bronchiale riconosciamo i fattori costituzionali, che predispongono gli individui all'insorgenza dall'asma, i fattori ambientali, che influenzano la suscettibilità all'insorgenza dell'asma in individui predisposti, e i fattori scatenanti, che riacutizzano o che determinano la persistenza dei sintomi asmatici.

3.2.2 Ruolo delle infezioni virali nelle riacutizzazioni

Esposizione ad allergeni, a inquinanti atmosferici, stress, esercizio fisico ed esposizioni

professionali sono i principali fattori, ma la causa più frequente di riacutizzazione, sia nei bambini che negli adulti, è rappresentata dalle infezioni virali delle vie aeree.

Nonostante un adeguato trattamento dell'asma, come suggerito dalle linee guida internazionali, le riacutizzazioni continuano a verificarsi.

Visto l'elevato impatto socio-sanitario delle riacutizzazioni asmatiche e sulla qualità di vita del paziente asmatico, l'elevata frequenza delle infezioni virali come causa di riacutizzazione asmatica e vista l'assenza, allo stato attuale, di presidi farmacologici specifici per il controllo o la prevenzione delle riacutizzazioni virus indotte, uno studio approfondito e dettagliato dei meccanismi attraverso i quali il virus porta alla comparsa di riacutizzazione è considerato un evento chiave per fornire nuovi possibili target di intervento farmacologico per diminuire la frequenza delle riacutizzazioni asmatiche. Studi recenti hanno documentato come nell'asma persistente, un'adeguata dose di glucocorticoidi per via inalatoria sia in grado di ridurre solo del 40% la comparsa di riacutizzazioni severe [79] invece questo non sembra verificarsi nei bambini asmatici in età scolare nei quali vi è una maggiore frequenza delle infezioni virali e l'insuccesso della terapia di fondo con glucocorticoidi è ancora maggiore [80].

Da questo si comprende quindi che vi è una differenza patogenetica tra asma in fase di stabilità, in cui i glucocorticoidi agiscono efficacemente nel controllo della malattia e riacutizzazioni asmatiche, nelle quali i virus oltre a rivestire un ruolo fondamentale, sembrano essere in grado di indurre uno stato transitorio di steroideo-resistenza.

Per molto tempo si è ritenuto che i comuni virus respiratori fossero responsabili di manifestazioni cliniche minori a carico dell'apparato respiratorio e che l'interessamento delle vie aeree inferiori si verificasse solo in particolari condizioni predisponenti: infanzia, senescenza, pazienti immunocompromessi.

Lo sviluppo di nuove tecnologie di biologia molecolare che consentono d'identificare la presenza dei virus respiratori in campioni biologici ottenuti dall'apparato respiratorio, ha fornito nuovi strumenti più specifici e sensibili per determinare il ruolo dei virus nelle malattie dell'apparato respiratorio [81, 82].

Johnston et al. nel 1995 con l'utilizzo della reazione a catena polimerasica (RT-PCR) hanno documentato che l'80-85% degli episodi di wheezing in bambini in età scolare era associato ad un'infezione virale delle vie aeree [83] e dopo questo ritrovamento numerosi studi hanno confermato, soprattutto nei bambini e nelle riacutizzazioni severe che richiedono l'ospedalizzazione, l'associazione tra infezioni virali delle vie aeree e riacutizzazioni asmatiche.

Per quel che riguarda la popolazione adulta, l'associazione tra riacutizzazione asmatica e

infezione virale delle vie aeree si assesta tra il 45 ed il 76% degli episodi di riacutizzazione, andando perciò in maniera importante ad incrementare la morbilità in corso di asma bronchiale.

Tra i virus respiratori il rinovirus (il virus responsabile del comune raffreddore) è quello più frequentemente identificato negli studi clinici, la sola eccezione è rappresentata dal virus respiratorio sinciziale più frequente negli episodi acuti in bambini in età prescolare [83-85].

Le infezioni virali a carico dell'apparato respiratorio superiore oltre ad aumentare la morbilità dell'asma incrementando il numero di riacutizzazioni, sembrano essere associate anche ad una maggiore gravità delle riacutizzazioni. Infatti, le infezioni virali respiratorie si associano all'ospedalizzazione per asma sia nei bambini che negli adulti [86, 87]. In uno studio recente si dimostra che nelle riacutizzazioni asmatiche nelle quali è stata identificata la presenza di un virus, si riscontra un FEV1 più basso, una maggiore necessità di ospedalizzazione e una degenza ospedaliera più prolungata rispetto alle riacutizzazioni nelle quali non erano stati isolati virus. In particolare è stata evidenziata la presenza di livelli maggiori di LDH nell'espettorato, marcatore della lisi cellulare e del danno epiteliale bronchiale indotti dal virus, nei pazienti nei quali si era isolato un virus. Il valore di LDH è risultato essere l'unico fattore predittivo per la durata dell'ospedalizzazione suggerendo quindi come l'infezione virale rappresenti l'evento causale della comparsa di riacutizzazione e che la severità della stessa dipenda dal danno provocato dal virus a livello dell'epitelio bronchiale [85].

Inoltre nella popolazione adulta durante l'inverno è stato riportato in numerosi studi un aumento della mortalità per asma, suggerendo come le infezioni virali, che risultano più frequenti durante l'inverno, possono essere ritenute causa di aumentata mortalità per asma negli adulti [88-90].

3.2.3 Meccanismi patogenetici delle infezioni virali nelle riacutizzazioni.

I meccanismi attraverso i quali i virus respiratori, in particolare i rinovirus, possono indurre una riacutizzazione asmatica non sono ancora del tutto chiariti.

Grazie a modelli sperimentali, sia in vitro che in vivo in asmatici volontari, è oramai assodato che le infezioni virali respiratorie possono riprodurre molte delle condizioni patogenetiche che caratterizzano l'asma bronchiale: aumento dell'iperreattività bronchiale, infiammazione con eosinofilia a livello delle vie aeree [91, 92].

Nel paziente asmatico l'infezione virale respiratoria determina un aumento dei sintomi a carico delle vie aeree inferiori (tosse e dispnea) ed un peggioramento della funzionalità respiratoria maggiore rispetto al paziente non asmatico. Tali manifestazioni cliniche sono il

risultato di un potenziamento della preesistente infiammazione presente nelle vie aeree inferiori dei pazienti asmatici indotta dal virus [93]. La maggior parte delle conoscenze relative ai meccanismi delle riacutizzazioni asmatiche virus-indotte derivano da infezioni sperimentali con rinovirus in asmatici volontari. La possibilità di creare nuovi farmaci per il trattamento delle riacutizzazioni dipenderà dalla miglior comprensione dei meccanismi attraverso i quali il virus è in grado di indurre la riacutizzazione, ma per ottenere tali informazioni è necessario prelevare materiale biologico da pazienti asmatici durante le riacutizzazioni, procedura non eseguibile per motivi etici e di sicurezza nei pazienti in fase di acuzie.

3.2.4 Infezioni virali respiratorie e riacutizzazioni: conseguenze cliniche e funzionali.

Le infezioni virali a carico delle alte vie aeree portano alla comparsa di manifestazioni cliniche di lieve entità che nei soggetti sani si autolimitano, tuttavia portano alla comparsa di riacutizzazione nei soggetti asmatici.

Tale maggiore suscettibilità dei pazienti asmatici, descritta in studi clinici che hanno osservato le riacutizzazioni asmatiche che insorgono naturalmente [94], è stata anche confermata in modelli sperimentali in vivo di infezione con rinovirus in soggetti sani ed asmatici. I soggetti asmatici sottoposti ad una infezione sperimentale con rinovirus manifestano una riduzione della funzionalità respiratoria [92,95] ed un aumento dell'iperreattività bronchiale [95]. Un recente studio ha dimostrato che i pazienti asmatici, in seguito ad infezione sperimentale in vivo con rinovirus, mostrano, rispetto ai controlli sani, una maggiore severità dei sintomi a carico delle vie aeree inferiori ed una maggiore caduta della funzionalità respiratoria. Lo stesso studio dimostra nei soggetti asmatici una correlazione diretta tra carica virale e severità dei sintomi respiratori, iperreattività bronchiale e infiammazione a livello delle vie aeree inferiori, evidenziando il ruolo determinante della replicazione virale e dell'infiammazione virus correlata nella riacutizzazione asmatica [96]. Tali dati complessivamente evidenziano una maggiore virulenza dell'infezione da rinovirus nei pazienti asmatici rispetto ai soggetti normali.

3.3 Ruolo della risposta Immunologica nelle riacutizzazioni di asma bronchiale virus indotte

Recentemente studi hanno evidenziato che i soggetti asmatici hanno una maggiore suscettibilità nei confronti delle infezioni virali respiratorie. Infatti, in seguito ad infezione virale i pazienti asmatici manifestano sintomi più severi a carico delle vie aeree inferiori ed un maggior peggioramento della funzionalità respiratoria rispetto ai soggetti sani [94]. Attualmente le ragioni di questa maggiore suscettibilità negli asmatici non sono conosciute. Un'ipotesi emergente, supportata da modelli sperimentali sia in vivo che in vitro, suggerisce che i pazienti asmatici possano avere una deficitaria risposta immunitaria, sia innata che specifica, verso le infezioni respiratorie virali. Tale risposta deficitaria giustificerebbe l'aumentata suscettibilità dei pazienti asmatici nei confronti delle infezioni virali.

La risposta immunitaria *innata o naturale* è il primo meccanismo di risposta messo in atto dall'organismo umano nei confronti dei virus. Questa risposta immunitaria è un evento aspecifico in quanto virtualmente possono essere messi in atto gli stessi meccanismi di difesa indipendentemente dal virus infettante ed è anche priva di memoria, una seconda esposizione allo stesso virus non evoca pertanto una risposta potenziata. Nell'incontro iniziale con un virus la risposta immunologica innata, che si instaura immediatamente dopo il contatto, rappresenta un evento fondamentale per prevenire una massiva distruzione tissutale e una disseminazione del virus. Infatti alcuni virus sono in grado di completare un intero ciclo replicativo in sole poche ore, sono invece necessari 3 o 4 giorni affinché una risposta immunitaria specifica nei confronti del virus raggiunga un livello minimo di efficacia. Ad un'iniziale risposta immunologica innata segue la risposta *specifico*. Questo tipo di risposta è caratterizzato dalla produzione di anticorpi ad opera dei linfociti B e dall'attivazione delle cellule T citotossiche grazie alla processazione e alla presentazione degli antigeni virali ad opera di cellule addizionali del sistema immunitario, le più importanti delle quali sembrano essere le cellule dendritiche. A differenza della risposta innata, l'immunità specifica ha una caratteristica peculiare rappresentata dalla memoria, che risulta in grado di garantire una risposta più intensa e mirata in seguito a reinfezione da parte del virus precedentemente incontrato.

Gli elementi caratterizzanti la risposta immunitaria innata comprendono:

- fagocitosi messa in atto da macrofagi e neutrofil;
- citochine e chemochine rilasciate da diversi tipi di cellule (macrofagi, neutrofil, mastociti, basofili e cellule epiteliali) con attività antivirale e/o immuno-regolatoria (come gli interferoni);

- cellule natural killer (NK) in grado di riconoscere e distruggere le cellule infettate dal virus, grazie a modificazioni indotte dal virus stesso o all'espressione di strutture virali sulla superficie;
- componenti presenti nei fluidi organici in grado di neutralizzare l'infettività virale indipendentemente o in associazione con gli anticorpi.

3.3.1 Azione antivirale degli interferoni.

Gli interferoni (IFN) rappresentano una famiglia multigenica di citochine inducibili dotate, oltre che della ben nota attività antivirale, anche di importanti funzioni immuno-regolatorie. Classicamente tale famiglia è suddivisa in due gruppi, gli interferoni di tipo I e gli interferoni di tipo II, recentemente è stata descritta una nuova famiglia di citochine inducibili dotata di attività antivirale denominata interferoni di tipo III. Gli interferoni di tipo I, anche denominati "interferoni virali" comprendono: IFN- α (di origine prevalentemente linfocitaria), IFN- β (di origine prevalentemente epiteliale e fibroblastica), IFN- κ , IFN- ω e IFN- ϵ . Il gruppo di tipo II è caratterizzato da un solo elemento denominato IFN- γ ; il gruppo di tipo III è una nuova famiglia di interferoni che comprende l'IFN- λ .

Le infezioni virali inducono la produzione di interferoni di tipo I e potenzialmente tutte le cellule sono in grado di produrre tali citochine. Invece la produzione di IFN- γ è indotta da stimoli mitogenici ed antigenici ed avviene solamente ad opera di alcune cellule del sistema immunitario tra le quali le cellule NK, i linfociti T CD4⁺ del sottotipo Th1 e le cellule CD8 citotossiche. Due importanti citochine in grado di promuovere la sintesi di IFN- γ sono IL-12 e IL-18, quest'ultima è una citochina proinfiammatoria Th1 appartenente alla famiglia della IL-1. La IL-12 è secreta dai fagociti mononucleati e dalle cellule presentanti l'antigene dopo infezioni con patogeni intracellulari. IL-18 ed IL-12 manifestano un effetto sinergico nell'induzione di IFN- γ mediante l'uso di meccanismi intracellulari differenti.

Il gruppo di geni per gli interferoni di tipo I comprendono nell'uomo 13 geni per IFN- α , un gene per IFN- β , un gene per IFN- κ , un gene per IFN- ω e un gene per IFN- ϵ , tutti localizzati sul braccio corto del cromosoma 9 e privi di introni. Il gene per IFN- γ contiene tre introni e mappa sul braccio lungo del cromosoma 12. Tali citochine seppur provenienti da fonti cellulari diverse sono tutte in grado, grazie ad un'azione autocrina sulle cellule infettate e paracrina, di indurre uno stato antivirale nelle cellule, grazie alla stimolazione della produzione di enzimi deputati in ultima analisi all'inibizione della replicazione virale. La ragione per cui esistono numerosi IFN dotati di azione simile è tuttora sconosciuta. Studi in modelli animali hanno dimostrato che la delezione del gene per l'IFN- β rende l'animale

particolarmente suscettibile alle infezioni virali e che i rimanenti IFN- α non sono in grado di compensare la perdita dell'IFN- β suggerendo un ruolo cardine di tale citochina nell'efficienza della risposta antivirale. È stato descritto un unico recettore di membrana per IFN- α , IFN- β e IFN- ω . Il recettore è caratterizzato da due subunità denominate IFNAR-1 e IFNAR-2. I geni per tali subunità sono localizzati sul cromosoma 21. Modelli animali hanno dimostrato che la delezione dei geni che sintetizzano tale recettore rende gli animali completamente incapaci di stabilire una adeguata risposta antivirale nonostante la presenza di un sistema immunitario per altro intatto e nonostante venga conservata la capacità di difesa nei confronti di alcuni patogeni. L'IFN- γ si lega ad uno specifico recettore di membrana diverso da quello usato dagli IFN di tipo I, anche esso presenta una struttura eterodimerica ed è composto da una subunità che lega in maniera specifica l'IFN- γ denominata IFNGR-1 ed una subunità accessoria denominata IFNGR-2. I geni di tali subunità nell'uomo sono localizzati rispettivamente sul cromosoma 6 e sul cromosoma 21. La delezione nei modelli animali dei geni per il recettore dell'IFN- γ porta ad una incapacità di instaurare un'adeguata risposta immunitaria nei confronti di numerosi patogeni e ad uno sviluppo alterato del sistema immunitario. Infatti il ruolo dell'IFN- γ è centrale sia nella risposta immunologica innata che in quella specifica essendo in grado di promuovere sia l'immunità naturale cellulo-mediata, tramite la stimolazione delle cellule NK, che l'attivazione dei macrofagi e agire direttamente sui linfociti T e B promuovendone la differenziazione. Infatti l'IFN- γ è in grado d'indurre la differenziazione dei linfociti T CD4⁺ in senso Th1 ed inibire la proliferazione delle cellule Th2. L'IFN- γ è una delle citochine necessarie per la maturazione delle cellule citotossiche CD8⁺ ed agisce sui linfociti B favorendo lo scambio verso le sottoclassi IgG e inibendo lo scambio verso le IgE. Questi due ultimi eventi rappresentano due meccanismi chiave della risposta immunologica adattativa nei confronti del virus [97-101].

In seguito ad un'infezione virale si verifica una massiccia produzione di IFN di tipo I. Tale evento può potenzialmente verificarsi a livello di qualunque tipo cellulare ed induce uno stato antivirale sostanzialmente attraverso due meccanismi. Il primo è rappresentato dall'induzione di una attività antivirale nelle cellule non ancora infettate, il secondo agisce attraverso l'induzione dell'apoptosi nelle cellule infettate. Quindi, l'inibizione della replicazione virale e la selettiva induzione dell'apoptosi nelle cellule infettate dal virus costituiscono la prima linea di difesa messa in atto dal sistema immunitario contro le infezioni virali. Oltre a questa azione diretta, gli IFN di tipo I sono anche in grado di contribuire in maniera indiretta alla risposta antivirale agendo sulle cellule del sistema immunitario. È noto ad esempio che anche gli IFN di tipo I sono in grado di attivare le cellule NK e i macrofagi. Più recentemente l'attenzione si

è spostata sul ruolo degli IFN di tipo I nel modulare la risposta immune adattativa. Evidenze recenti dimostrano infatti che tali interferoni influiscono sulla proliferazione e sopravvivenza dei linfociti T CD8⁺ e sembrano essere in grado di indurre un'efficace risposta ad opera dei linfociti B.

Gli interferoni di tipo III si legano ad un unico recettore eterodimerico composto da CRF2-12 e CRF2-4. Le infezioni virali inducono un aumento dell' m-RNA IFN- λ in cellule epiteliali, cellule mononucleate del sangue periferico e cellule dendritiche. Tale INF- λ induce uno stato antivirale.

Modelli animali hanno consentito di documentare i principali eventi immunologici che caratterizzano un'infezione virale delle vie aeree. Durante una tipica infezione virale primaria delle vie aeree, il virus infetta e si moltiplica a livello dell'epitelio di rivestimento del tratto respiratorio raggiungendo un picco massimo in media dopo circa due giorni. Uno dei primi meccanismi di difesa messi in atto dal sistema immunitario è rappresentato dalla produzione di IFN di tipo I. Tale risposta rapida raggiunge l'apice dell'efficienza dopo circa 24-48 ore per poi estinguersi tra la 7[^]-8[^] giornata dopo l'infezione. Gli interferoni attivano le cellule NK, le quali risultano rilevabili a livello polmonare a partire dalla 3[^] giornata dopo l'infezione e raggiungono un picco in 4[^] giornata. Oltre a provvedere alla distruzione delle cellule infettate le cellule NK rilasciano citochine tra le quali l'IFN- γ in grado di attivare altre cellule infiammatorie del sistema immunitario. Questi eventi, facenti parte della risposta immunitaria innata, rappresentano meccanismi essenziali nella risposta precoce contro i virus nei primi giorni dopo l'infezione. Durante questa prima fase della risposta immunologica gli antigeni virali vengono processati a livello dei linfonodi locali ad opera della cellule dendritiche e presentati ai linfociti T. La risposta messa in atto dai linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ inizia circa 4-6 giorni dopo l'infezione con un picco di attività intorno alla 7[^] giornata per poi scemare progressivamente fino alla 14[^] giornata. Tuttavia cellule della memoria immunologica CD4⁺ e CD8⁺ possono persistere per tutta la vita. Il reclutamento di cellule T dipende sia dalla produzione di chemochine che dall'espressione di molecole di adesione a livello endoteliale nella sede di infiammazione. Anche la risposta mediata dai linfociti B e la conseguente produzione di anticorpi richiede tempo affinché possa instaurarsi in maniera efficace. I primi anticorpi prodotti sono le IgA presenti a partire dalla 3[^] giornata a livello della mucosa sede di infezione, seguono a partire dalla 5[^]-6[^] giornata le IgM sieriche e poi compaiono in 7[^]-8[^] giornata le IgG. Progressivamente vi è un incremento della produzione di anticorpi e aumenta anche la loro avidità nei confronti degli antigeni specifici durante le successive 2 settimane. Le IgA raggiungono livelli non dosabili dopo circa 3-6 mesi mentre le IgG sieriche possono

rimanere dosabili per tutta la vita. Meccanismi immunologici specifici, facenti parte della risposta immunologica adattativa, come l'azione delle cellule citotossiche CD8⁺ e la produzione di anticorpi specifici, che seguono la risposta innata, sono necessari per completare l'eradicazione dell'infezione virale. Affinché l'infezione virale sia adeguatamente eradicata è quindi necessario che si instauri un'efficiente risposta immunologica innata, nella quale gli interferoni e le cellule NK giocano un ruolo fondamentale e una successiva risposta adattativa orientata in senso Th1, grazie all'azione di numerose citochine tra cui soprattutto l'IFN- γ , con attivazione di linfociti T citotossici CD8⁺ e successiva produzione di anticorpi specifici.

3.3.2 Risposta immunologica innata nei pazienti asmatici.

Solide evidenze hanno documentato che in seguito ad infezione sperimentale con rinovirus i pazienti asmatici manifestano una deficitaria risposta immunologica innata a livello delle vie aeree. Infatti, l'infezione ex vivo di cellule epiteliali bronchiali prelevate da pazienti asmatici è caratterizzata da una produzione deficitaria di IFN- β , IFN- λ e una ridotta apoptosi rispetto all'infezione in cellule prelevate da donatore sano [102, 103]. La produzione di IFN correla inversamente con l'aumentata replicazione virale che si verifica a livello delle cellule epiteliali bronchiali di pazienti asmatici [102].

Pertanto la ridotta produzione di IFN a livello delle cellule epiteliali bronchiali, sede elettiva dell'infezione virale, di pazienti asmatici potrebbe rappresentare il meccanismo immunitario in grado di giustificare l'aumentata replicazione virale e virulenza dell'infezione virale stessa che si verifica nelle vie aeree di pazienti asmatici. La ridotta risposta immunitaria innata è stata riscontrata sia nei pazienti asmatici trattati con steroidi per via inalatoria sia in quelli non trattati con steroidi, indicando che i difetti della risposta immunitaria innata non sono il risultato del trattamento con steroidi e che gli steroidi non hanno effetti sulla risposta immunologica innata in termini di apoptosi e produzione di interferone [102, 103]. Tale dato sperimentale è in accordo con l'osservazione clinica dell'inefficacia degli steroidi inalatori nelle riacutizzazioni asmatiche virus indotte. Una deficitaria produzione di IFN- λ è stata documentata anche in seguito ad infezione ex vivo con rinovirus in macrofagi alveolari prelevati da paziente asmatico rispetto a donatori sani. Inoltre lo stesso difetto immunologico fa seguito alla stimolazione dei macrofagi alveolari di pazienti asmatici con lipopolisaccaride batterico [102].

Nel loro insieme questi dati dimostrano che la risposta immunologica innata nei pazienti asmatici non è specifica per una singola molecola antivirale, un tipo cellulare o uno stimolo

patogeno, ma rappresenta una risposta immunologica innata alterata caratteristica dei pazienti asmatici. Tale alterata risposta immunologica innata rappresenta un possibile meccanismo in grado di giustificare l'aumentata suscettibilità dei pazienti asmatici nei confronti delle infezioni virali. Infatti è stato dimostrato che la produzione di IFN- λ correla inversamente con la severità della riacutizzazione asmatica indotta sperimentalmente dall'infezione in vivo con rinovirus. Dopo infezione sperimentale in vivo con rinovirus minore è la produzione di IFN- λ , maggiore sono i sintomi della riacutizzazione, e la caduta della funzionalità respiratoria, mentre maggiori sono la carica virale nel BAL e l'infiammazione presente a livello delle vie aeree [98]. Tuttavia non sono noti i meccanismi che causano nei pazienti asmatici una deficitaria risposta immunologica innata.

3.3.3 Risposta immunologica acquisita antivirale nei pazienti asmatici.

Per consentire una adeguata risposta immunitaria antivirale, oltre ad un'efficace risposta immunologica innata è necessaria anche un'efficiente risposta immunologica acquisita, orientata in senso Th1. È stato ipotizzato che la preesistente infiammazione di tipo Th2 presente a livello delle vie aeree dei pazienti asmatici possa alterare la normale risposta Th1 antivirale verso un'inappropriata e potenzialmente nociva risposta di tipo Th2. È stato dimostrato, utilizzando un modello murino di asma bronchiale, che la presenza di un'infiammazione Th2 a livello delle vie aeree inferiori causa un'aumentata produzione da parte di linfociti T CD8+ di IL-5 (Th2) piuttosto che di INF- γ (Th1) dopo una infezione virale. Tale risposta alterata porta ad un accumulo a livello delle vie aeree di eosinofili, invece che di neutrofili [104].

Modelli sperimentali in vitro hanno dimostrato che l'esposizione delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) al rinovirus causa la produzione di IFN- γ e IL-12 (citochine tipo 1 prodotte dalle cellule T CD4+ e dai monociti) sia nei soggetti asmatici che nei controlli normali. Tuttavia le cellule mononucleate del sangue periferico provenienti da soggetti asmatici producono livelli significativamente inferiori di IL-12 e IFN- γ dimostrando un difetto nella produzione di citochine tipo 1. Inoltre il rinovirus induce la produzione di IL-4 da parte delle PBMC solamente nei soggetti asmatici. Pertanto nei pazienti asmatici, in seguito ad infezione con rinovirus in PBMC, si verifica una deficitaria risposta immunologica Th1 ed un'anomala risposta Th2 [105].

Studi in vivo hanno evidenziato che una sbilanciata risposta immunologica in senso Th2 piuttosto che Th1 condiziona la risposta antivirale. Gern et al. hanno dimostrato una correlazione inversa tra il rapporto IFN- γ /IL-5 (ovvero Th1/Th2) nell'espettorato di soggetti

asmatici dopo infezione sperimentale con rinovirus sia nei sintomi clinici dell'infezione che nel tempo di eliminazione del virus dall' espettorato. Ovvero maggiore è la produzione di citochine di tipo Th1 (IFN- γ) minore è la severità della sintomatologia clinica dell'infezione virale sperimentale con rinovirus e più rapida ed efficace è l'eliminazione del virus stesso dalle vie aeree [106]. Inoltre è stato dimostrato che maggiore è la produzione in vitro di citochine Th1 (IFN- γ) in PBMC di pazienti asmatici dopo infezione con rinovirus, minore è l'iperreattività bronchiale e migliore è la funzionalità respiratoria [107].

Questi risultati pertanto mostrano che un'alterata risposta immunologica antivirale Th1 non solo è una caratteristica dei pazienti asmatici ma sembra anche riflettere la severità della malattia e contribuire ad un'aumentata suscettibilità dei pazienti asmatici nei confronti delle infezioni virali.

In conclusione quindi, numerose evidenze documentano che nei pazienti asmatici si verifica un'alterata/ridotta risposta immunitaria innata [102, 103] e un'alterata risposta immunologica acquisita orientata in senso Th2 piuttosto che Th1 [105, 106]. Tuttavia non sono noti i meccanismi che causano un'alterata risposta immunitaria. In particolare non è noto se la preesistente risposta infiammatoria di tipo Th2 presente a livello delle vie aeree inferiori dei pazienti asmatici, oltre ad essere in grado di alterare la normale risposta immunitaria Th1 antivirale, possa causare anche un'alterata risposta immunologica innata.

CAPITOLO 4

Dati sperimentali

4.1 Asma bronchiale con ostruzione fissa e BPCO: 5 anni di follow up

Un asma di vecchia data può portare ad un rimodellamento delle vie aeree e ad un ostruzione bronchiale fissa in termini di funzionalità polmonare: questo quadro funzionale, se non viene presa in considerazione anche la storia clinica del paziente, può portare ad una diagnosi non corretta di BPCO. Studi epidemiologici hanno dimostrato che circa il 30 % dei pazienti con ostruzione fissa ha una storia di asma bronchiale [108]. Alcune linee guida internazionali si raccomandano comunque di classificare l'asma bronchiale con ostruzione fissa come BPCO [109, 110]. Inoltre molti dei dati disponibili sulla mortalità e morbilità della BPCO, sono basati sulla combinazione di bronchite cronica, enfisema ed asma (codici 40-47 ICD).

L'eziologia della persistente limitazione del flusso aereo nei pazienti asmatici è poco conosciuta, nonostante la maggior parte degli studi indica che la perdita funzionale è correlata ai processi infiammatori a carico della parete delle vie aeree [111, 112]. È stato dimostrato che nei pazienti asmatici non fumatori con diagnosi di asma bronchiale severo persistente, nonostante un trattamento intensivo con terapia antiasmatica, l'ostruzione bronchiale fissa è un fenomeno frequente. I fattori che si associano a tale ostruzione bronchiale fissa sono correlati all'insorgenza dell'asma in età adulta, aumento dell'iperreattività bronchiale, e soprattutto all'eosinofilia nell'espettorato [113]. Gli eosinofili sono capaci di stimolare in vitro la replicazione dei fibroblasti [114; 115], ed in vivo sono una importante fonte di produzione per il TGF- β [116] una citochina importante con un ruolo determinante per le alterazioni fibrotiche che si verificano nelle vie aeree dei pazienti asmatici. Nell'asma bronchiale, l'infiltrazione delle vie aeree da parte di eosinofili e linfociti CD 4+ è accompagnato ad un rimodellamento delle vie aeree caratterizzato da vasodilatazione, eccessiva produzione di muco ed essudato, perdita delle cellule epiteliali, aumentato numero delle cellule caliciformi, ipertrofia muscolare liscia e deposito di collagene a livello epiteliale. I cambiamenti strutturali a carico delle vie aeree (meno nel parenchima polmonare) possono restringere ed obliterare il lume delle vie aeree e di conseguenza diventare i maggiori fattori determinanti l'ostruzione bronchiale nell'asma [117]

Nei pazienti BPCO, l'ostruzione bronchiale è correlata alle alterazioni strutturali che si verificano nelle vie aeree (specie in quelle di minor calibro) e nel parenchima polmonare. L'infiltrazione delle vie aeree da parte dei neutrofili e linfociti CD 8 + è accompagnato ad un

rimodellamento delle vie aeree, caratterizzata da metaplasia delle cellule caliciformi e tappi di muco, ipertrofia muscolare liscia, fibrosi e distorsione delle vie aeree che restringe ed oblitera il lume delle vie aeree (118). Anche le alterazioni a carico del parenchima polmonare contribuiscono all'ostruzione bronchiale della BPCO attraverso una riduzione del ritorno elastico dovuto alla perdita degli attacchi alveolari.

Tuttavia è oggi importante distinguere clinicamente i pazienti con BPCO e componente asmatica sulla base della loro risposta ai farmaci broncodilatatori ed ai glucocorticoidi per via inalatoria e/o sistemica in quanto essi sembrano avere un diverso decorso clinico ed una migliore prognosi, rispetto agli altri pazienti con BPCO.

Numerosi studi hanno confrontato l'infiammazione bronchiale nell'asma e la BPCO (119, 120, 121, 122). La maggior parte di questi studi è stata eseguita mettendo a confronto pazienti asmatici giovani con ostruzione bronchiale variabile con pazienti BPCO con ostruzione fissa. I risultati di questi studi hanno dimostrato che nell'asma bronchiale l'ostruzione variabile del flusso aereo è associata ad una infiammazione delle vie aeree caratterizzata da un aumento del numero dei T Linfociti (prevalentemente CD4+) e degli eosinofili e da un aumentato ispessimento dello strato reticolare della membrana basale epiteliale [117]. Nei pazienti BPCO l'ostruzione bronchiale fissa è associata ad un aumento dei linfociti T (prevalentemente CD 8+), macrofagi e neutrofili [123, 124]. Altri studi invece hanno confrontato pazienti asmatici giovani con asma bronchiale steroide dipendente con pazienti BPCO più anziani e con ostruzione bronchiale fissa.

In uno studio di Fabbri e collaboratori pubblicato nel 2003 le caratteristiche dell'infiammazione bronchiale sono state studiate in pazienti con ostruzione bronchiale fissa che presentavano una storia clinica diversa (asma o BPCO), ma confrontabili per età e grado di severità di ostruzione bronchiale documentata con la spirometria [125] E' stato dimostrato che i pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa hanno caratteristiche funzionali e patologiche diverse rispetto ai pazienti BPCO. Anche in presenza di ostruzione bronchiale fissa, nei pazienti con storia di asma, le alterazioni infiammatorie sono le stesse di quelle dei pazienti asmatici con ostruzione variabile espressa sia in termini di infiltrati cellulari che di aumento di spessore dello strato reticolare della membrana basale. Il significato di questi risultati è che pur in presenza di ostruzione bronchiale fissa l'asma dovrebbe essere diagnosticata come tale e non come BPCO.

La relazione tra infiammazione delle vie aeree ed ostruzione bronchiale è poco conosciuta sia nell'asma che nella BPCO. L'aumento di un particolare tipo di cellule come eosinofili e linfociti CD 4+ nell'asma e dei neutrofili e linfociti CD 8+ nella BPCO, sono non solo i

maggiori fattori determinati dell'ostruzione del flusso aereo, ma anche marcatori di due cascate infiammatorie diverse che a loro volta potrebbero portare alla stessa anomalia funzionale: ostruzione bronchiale fissa. Nei pazienti con storia di asma bronchiale ed ostruzione fissa è stato osservato un maggiore numero di eosinofili e minore numero di neutrofili sia nell'espettorato, nel lavaggio bronchiolo-alveolare e nelle biopsie bronchiali. Anche i livelli dell'ossido nitrico nell'aria espirata sono maggiori in questo gruppo di pazienti rispetto a quelli BPCO con ostruzione fissa. I metodi non invasivi come l'analisi citologica dell'espettorato e la misura dell'ossido nitrico possono risultare clinicamente utili nel distinguere l'asma dalla BPCO quando non è presente una chiara storia clinica o quando vi sono numerosi fattori di rischio (pazienti asmatici che fumano o pazienti BPCO che hanno sintomi frequenti). L'iperreattività bronchiale è poco utile nel distinguere queste due forme di patologie una volta che l'ostruzione bronchiale fissa si è instaurata.

Anche le caratteristiche funzionali polmonari (espresse in termini di risposta agli steroidi, volume residuo e capacità polmonare), gli scambi gassosi valutati con emogasanalisi arteriosa e le alterazioni enfisematose osservabili con la TC ad alta risoluzione sono diverse nei due gruppi dei pazienti [125]. Nei pazienti asmatici con ostruzione fissa il riscontro di un'alta capacità di diffusione e di alti valori di PaO₂ e di un basso volume residuo e basso score dell'enfisema valutato con la TC ad alta risoluzione suggerisce che il parenchima polmonare in questo gruppo di pazienti è meno coinvolto rispetto ai pazienti BPCO. Al contrario, una bassa capacità di diffusione e bassi livelli di PaO₂, un elevato volume residuo ed elevato score dell'enfisema suggerisce che nei pazienti BPCO con ostruzione fissa è presente distruzione parenchimale.

Queste differenze in termini funzionali e patologici potrebbero spiegare la migliore prognosi [126; 127] e la migliore risposta agli steroidi descritta in pazienti asmatici con ostruzione fissa rispetto ai pazienti BPCO con ostruzione fissa. Quello che non è mai stato osservato è come variano a distanza di anni i parametri clinici, funzionali, infiammatori confrontando questi due gruppi di pazienti, in modo da poter permettere di capire se vi sono modificazioni o punti di incontro fra le due patologie tali da poter aprire nuove strategie terapeutiche.

Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio consiste nel valutare durante un periodo di follow up di 5 anni l'andamento clinico, funzionale ed infiammatorio di pazienti asmatici con ostruzione fissa rispetto ai pazienti BPCO. In particolare abbiamo voluto valutare l'andamento clinico dei pazienti compresa la storia di riacutizzazioni, la funzionalità polmonare in termini di

ostruzione bronchiale (FEV1, della Capacità Vitale lenta e forzata, Volume Residuo, Capacità Polmonare Totale e Diffusione alveolo-capillare del CO), misurazione dell'ossido nitrico nell'aria espirata e valutazione delle cellule infiammatorie presenti nell'espettorato spontaneo od indotto.

Pazienti dello studio

Sono stati inseriti nello studio pazienti asmatici e BPCO con ostruzione bronchiale fissa già noti e seguiti per un periodo di 5 anni presso il Centro di Ricerca su Asma e BPCO-Università degli Studi di Ferrara. La popolazione dello studio consisteva in una coorte di pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa (n=19) e BPCO (n=27). La presenza di ostruzione bronchiale fissa sia in pazienti asmatici che in pazienti BPCO era determinata dal rapporto FEV1/FVC inferiore del 70% rispetto al valore teorico con valori del FEV1 che non si modificava dopo somministrazione del broncodilatatore.

Originariamente, per questi pazienti, come precedentemente descritto in un altro studio cross sezionale [125], la diagnosi di ostruzione bronchiale fissa in pazienti asmatici e BPCO era stata fatta oltre che sulla storia clinica anche sulla mancata reversibilità non solo al test di broncodilatazione ma anche dopo breve ciclo di corticosteroidi per via sistemica (prednisone 50 mg/die per 15 giorni) [125].

Abbiamo inoltre valutato anche un terzo gruppo di pazienti asmatici con ostruzione bronchiale completamente reversibile (n=15) che avevano una simile severità di ostruzione bronchiale e simile età media agli altri due gruppi in modo da poter confrontare il declino della funzionalità respiratoria.

Criteri di inclusione

- Pazienti di entrambi i sessi di età maggiore di 50 anni, già noti per essere affetti da BPCO ed asma bronchiale con ostruzione bronchiale fissa definito come rapporto FEV1/CVF post broncodilatazione inferiore al 70%.
- Pazienti asmatici con storia clinica di tosse, dispnea, respiro sibilante e sensazione di costrizione toracica con ostruzione variabile nelle precedenti spirometrie.
- Pazienti BPCO con storia clinica di tosse, espettorato e dispnea ed occasionali episodi di respiro sibilante ma che non presentavano ostruzione variabile nelle precedenti spirometrie.
- Pazienti non fumatori o ex fumatori da più di 12 mesi di più di 20 pack/years.

Criteri di esclusione

- Assenza di riacutizzazione della sintomatologia respiratoria negli ultimi 3 mesi precedenti lo studio di intensità tale da richiedere un trattamento farmacologico mirato.
- Pazienti in terapia con glucocorticoidi per via orale.

Condizione dello studio

I pazienti con BPCO ed asma bronchiale con ostruzione fissa che sono stati informati oralmente e per iscritto degli scopi dello studio e che hanno dato il loro consenso scritto sono stati sottoposti ai seguenti accertamenti:

- Storia clinica ed esame obiettivo di routine;
- Prove di funzionalità respiratoria completa (curva flusso/volume, volume residuo, capacità polmonare totale, diffusione alveolo-capillare al CO).
- Misurazione dell'ossido nitrico nell'aria espirata
- Raccolta di 1 campione di espettorato (indotto o spontaneo) per esame citologico.

Metodi

Prove di funzionalità respiratoria

Le prove di funzionalità respiratoria (Biomedin Spirometer, Padova, Italia) sono state condotte secondo metodiche standardizzate dalla European Respiratory Society [5].

Misura dell'ossido nitrico (NO) nell'aria espirata

La misura dell'ossido nitrico nell'aria espirata è stata effettuata con un analizzatore di chemiluminescenza (NOA 280; Sievers, Boulder, CO) ad alta risoluzione (0.5 ppb) con una sensibilità da 1 a 500 ppb per volume, accuratezza 0.5 ppb e tempo di risposta < 2 sec. La misura è stata effettuata come descritto da Kharnitov e collaboratori [128], in accordo con le linee Guida Europee per la misura dell'ossido nitrico nell'aria espirata [128].

Raccolta e processazione dell'espettorato

L'espettorato è stato raccolto dopo inalazione del broncodilatatore e successivamente analizzato. In caso di mancanza di espettorato spontaneo veniva raccolto l'espettorato indotto. L'induzione dell'espettorato è stata eseguita come descritto da Pin [129; 130]) previa autorizzazione da parte del paziente con firma del consenso informato su apposito modulo. Il FEV1 e la CVF sono stati misurati prima e 15 minuti dopo la inalazione di 200 mg di salbutamolo. È stata poi nebulizzata per periodi di 5 minuti una soluzione salina ipertonica usando un nebulizzatore ultrasonico per un totale di 20 minuti, per indurre espettorato nei

pazienti che ne fossero privi. Il FEV1 è stato misurato ogni 5 minuti durante la nebulizzazione per valutare l'eventuale manifestarsi di broncocostrizione. Ogni 5 minuti è stato chiesto al soggetto di espettorare, dopo ripetuti colpi di tosse, all'interno di una capsula di Petri. La nebulizzazione è stata sospesa comunque dopo quattro esposizioni alla nebbia ultrasonica, e/o se durante la nebulizzazione il VEMS diminuiva di almeno il 20% dal valore di base, o si manifestavano sintomi insopportabili da parte del paziente, o se si otteneva un campione adeguato di espettorato in qualità [131] e in quantità (a discrezione dell'operatore).

L'analisi citologica dell'espettorato in tutti i casi è iniziata entro tre ore dal momento della raccolta [132], ed è stata condotta presso il Laboratorio di Ricerca Sull'Asma Bronchiale dell'Università di Ferrara. L'esame citologico dell'espettorato è stato eseguito come descritto da Popov [133]. Dal campione di espettorato raccolto, sono stati prelevati i frustoli di cellule, separandoli dalla saliva, messi in una provetta Eppendorf e pesati. Al campione selezionato nella provetta, è stato aggiunto 1 ml di una soluzione di ditiotreitolo (1 M) diluita in soluzione tamponata con fosfato (PBS) in rapporto di 1: 10, avendo cura di disperdere i frustoli mediante microaspirazioni, utilizzando una pipetta Pasteur in plastica. Dopo aver sciolto la sospensione cellulare, questa è stata filtrata utilizzando una garza di nylon con pori del diametro di 52 µm (BNSH Thompson Scarborough Ontario Canada), per rimuovere i detriti ed il muco. La sospensione così ottenuta, è stata centrifugata per 3 minuti alla velocità di 350 giri/minuto. Le cellule, che così si sono depositate sul fondo della provetta, sono state risospese ed il volume quantificato. A questo è stata aggiunta una quantità di PBS sufficiente per portare la soluzione al volume finale di 1 ml prelevati 20 µl di questa sospensione che sono stati trasferiti in una provetta in cui, in precedenza, erano stati posti 20 µl di colorante Tripian blue. Una piccola quantità della sospensione così colorata, è stata collocata in una camera conta cellule di Burker per l'esecuzione della conta cellulare totale e per l'analisi della vitalità delle cellule secondo il metodo di esclusione del Tripian blue. In seguito la sospensione è stata portata ad una diluizione di 4×10^5 cellule/ml. Da questa diluizione sono stati prelevati di volta in volta 100 µl, successivamente posti in ogni pozzetto della citocentrifuga e centrifugandoli per 6 minuti alla velocità di 450 giri/minuto. I vetrini così ottenuti sono stati lasciati asciugare per 24 ore. Due di questi vetrini sono stati fissati in una soluzione di acetone/metanolo (in rapporto 1 :2) e colorati con il May Grünwald Giemsa per la conta differenziale dei leucociti e delle cellule epiteliali squamose, utilizzando un microscopio ottico all'ingrandimento di 40X. Sono state contate 400 cellule per ciascun vetrino, scegliendo aree di conta non sovrapposte.

Un campione veniva considerato adeguato se la percentuale delle cellule epiteliali squamose era minore del 20% di tutte le cellule [131]. Per correggere la variabile della contaminazione salivare, i risultati della conta differenziale dei leucociti sono state espressi come percentuale delle cellule nucleate escludendo le cellule squamose [131]. I vetrini non colorati sono stati archiviati in congelatore alla temperatura di -20°C per eventuali successivi studi citologici o di immunocitochimica.

Analisi statistica

Il declino della funzionalità respiratoria all'interno dei gruppi di studio gruppi è stato eseguito mediante 1-way ANOVA. Le differenze ai vari time points rispetto al basale sono state valutate mediante t test. Il confronto dell'andamento del declino funzionale tra i gruppi è stato eseguito mediante 2-way ANOVA. Le differenze ai vari time points tra i gruppi sono state valutate mediante t test per dati non appaiati. Il confronto del declino della funzionalità respiratoria tra i due gruppi è stato valutato usando 2-way ANOVA. I confronti tra i gruppi sono stati valutati usando ANOVA e il test di t student o il test di kruskal-Wallis e Mann Whitney quando appropriati. L'analisi di regressione lineare è stata utilizzata quando appropriato, ed è stato eseguito test Pearson per studiare le correlazioni. L'analisi delle curve ROC è stata eseguita per verificare la capacità dei parametri infiammatori a predire la caduta della funzionalità respiratoria e gli outcomes. La significatività statistica è stata considerata per $p < 0.05$. In caso di comparazioni multiple, i valori di p sono stati aggiustati usando la correzione di Bonferroni.

Risultati

Caratteristiche della popolazione.

I pazienti arruolati nei due gruppi di studio non presentano differenze significative in termini di età, sesso ed in termini di grado di ostruzione bronchiale (vedi Tabella 1). I 3 gruppi di pazienti avevano esposizione simile a corticosteroidi per via inalatoria e beta due agonisti a lunga durata d'azione.

Characteristic	Patients with fixed airflow obstruction, asthma		Patients with fixed airflow obstruction, COPD		Asthma with reversible airflow obstruction	
	Baseline	End of study	Baseline	End of study	Baseline	End of study
No. of patients	16		21		15	
Age (y)	64.5 ± 2.1		66.2 ± 1.1		63.9 ± 2.7	
Sex (M/F)	10/6		17/4		10/5	
Smoking history (pack-years)	13 NS, 3 exS (0.9 ± 0.4)		19 exS, 2 S (41.8 ± 3.8)*		13 NS, 2 exS (0.7 ± 0.2)	
Positive skin prick test response, no. (%)	15 (93)‡		1 (5)		12 (80)‡	
FEV ₁ (L)	1.63 ± 0.08	1.47 ± 0.11§	1.60 ± 0.10	1.37 ± 0.10§	1.71 ± 0.14	1.65 ± 0.13
FEV ₁ (% predicted)	54.7 ± 2.4	51.0 ± 3.1§	56.6 ± 2.2	51.9 ± 2.9§	58.9 ± 2.6	58.5 ± 2.5
FEV ₁ after bronchodilator (L)	1.88 ± 0.10	1.63 ± 0.09§	1.73 ± 0.10	1.47 ± 0.12§	2.18 ± 0.09	2.09 ± 0.12¶
FEV ₁ after bronchodilator (% predicted)	63.4 ± 2.8	56.6 ± 3.0§	61.1 ± 2.1	55.2 ± 2.8§	75.1 ± 2.1¶	74.2 ± 2.6¶
FEV ₁ /FVC ratio after bronchodilator (%)	53.2 ± 1.7	53.0 ± 1.3	51.4 ± 2.1	50.4 ± 2.3	72.1 ± 1.9¶	72.1 ± 2.0¶
ΔFEV ₁ after bronchodilator (mL)	246 ± 32	228.6 ± 29	124 ± 15	115 ± 19	461 ± 45	432 ± 38
ΔFEV ₁ after bronchodilator	8.4 ± 1.6	8.1 ± 1.1	4.4 ± 1.0	4.4 ± 1.2	15.8 ± 1.8¶	14.9 ± 1.4¶

Tabella 1: caratteristiche cliniche e demografiche

Andamento della funzionalità respiratoria.

Sia i pazienti con asma con ostruzione bronchiale fissa che i pazienti con BPCO manifestano nell'arco di 5 anni una caduta significativa del FEV₁. Il valore medio di caduta del FEV₁ era -50 ±6.8 ml/anno, corrispondente ad un percentuale di caduta per anno di -1.28 ±0.18% del valore predetto all'anno.

I pazienti con asma con ostruzione fissa manifestano una progressiva caduta del FEV₁ (p<.001 ANOVA). Nei pazienti asmatici con ostruzione fissa la caduta del FEV₁ è pari -49.7±10.6 ml/anno, corrispondente ad una percentuale di declino -1.37% ± 0.28% del valore predetto/anno. Nei pazienti con BPCO si assiste ad una progressiva caduta del FEV₁ (p<.001 ANOVA) durante i 5 anni. Il valore medio di caduta del FEV₁ era -51.4 ±9.8 ml/anno, corrispondente ad una percentuale di declino del FEV₁ -1.19%±0.24% del valore predetto/anno. Nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale completamente reversibile non si è evidenziata una variazione significativa del FEV₁ post bronco dilatazione. Nessuno dei pazienti con ostruzione bronchiale completamente reversibile ha sviluppato una ostruzione bronchiale fissa durante il periodo di 5 anni di follow up.

Il declino della funzionalità respiratoria/anno nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa e BPCO era simile ed era maggiore rispetto a quello dei pazienti asmatici con ostruzione completamente reversibile al broncodilatatore (fig.1 e 2).

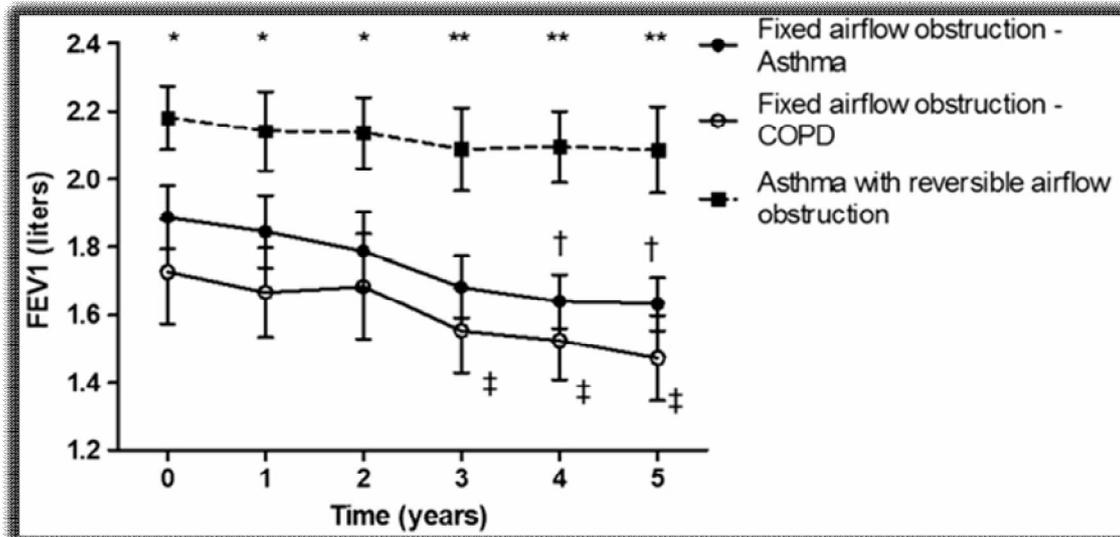


Fig.1: Variazioni del FEV1 post bronco dilatazione in 5 anni di follow up

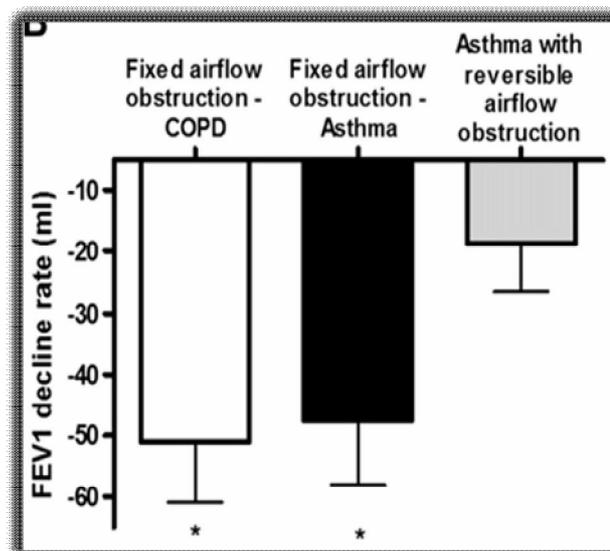


Fig.2: Valore medio di caduta del FEV1 in ml post broncodilatazione/anno

Il volume residuo non era significativamente cambiato durante i 5 anni di follow up sia nel gruppo dei pazienti con asma bronchiale con ostruzione fissa che nei pazienti BPCO.

Il valore di KCO dopo 5 anni era significativamente ridotto rispetto al valore base sia nei pazienti BPCO che nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa. La percentuale di variazione di KCO era significativamente inferiore in pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa rispetto ai pazienti BPCO. Durante il periodo di 5 anni, il gruppo di controllo di pazienti asmatici con ostruzione bronchiale completamente reversibile non ha mostrato

variazioni del Volume Residuo e di KCO (tabella 2)

	Patients with fixed airflow obstruction - Asthma		Patients with fixed airflow obstruction - COPD		Asthma with reversible airflow obstruction	
	Baseline	End of study	Baseline	End of study	Baseline	End of study
RV,% predicted	100.5±5.4	106.1±3.9	132.8±6.3*	144.9±5.8*‡	101.6±5.9	99.3±4.3
Kco, % predicted	80.3±4.1	71.7±3.5‡	65.7±5.3	48.1±4.6‡	85.1±4.9	88.3±6.1

Tab. 2: Correlazioni tra caduta della funzionalità respiratoria e: caratteristiche funzionali ed infiammazione nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa.

La conta cellulare totale delle cellule dell'espettorato non si è modificata significativamente durante i 5 anni di follow up nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa e BPCO. La conta degli eosinofili nell'espettorato era significativamente maggiore nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa rispetto ai pazienti BPCO sia all'inizio che al termine dello studio. Viceversa la conta dei neutrofili nell'espettorato era significativamente maggiore nei pazienti BPCO rispetto ai pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa sia all'inizio che al termine dello studio. Nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa la percentuale degli eosinofili nell'espettorato, seppur maggiore rispetto ai pazienti BPCO, si è ridotta nel tempo ($p < 0.01$ ANOVA).

Abbiamo inoltre rilevato che la percentuale degli eosinofili nell'espettorato dei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa, documentata all'inizio dello studio, correla direttamente con la caduta del FEV1 durante i 5 anni di studio ($p < 0.05$, $r = -0.53$) (Fig.3)

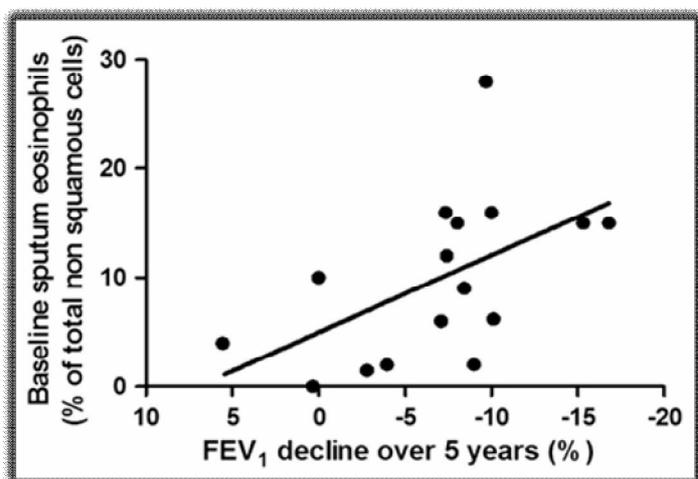


Fig.3 correlazione tra percentuale degli eosinofili all'inizio studio nei pazienti asmatici con ostruzione fissa e caduta del FEV1 dopo 5 anni.

Abbiamo documentato che la percentuale di neutrofili nell'espettorato, documentata all'inizio dello studio, correla direttamente con la caduta del FEV1 (%) durante l'arco di 5 anni di follow-up nei pazienti con BPCO ($p < 0.05$ $r = -0.49$) (fig. 4).

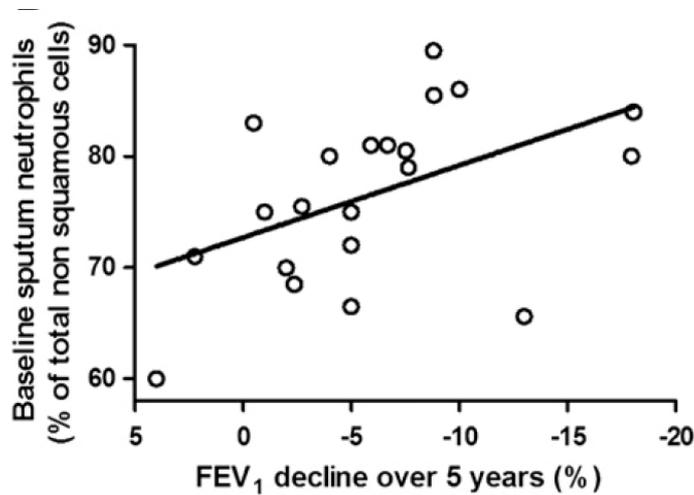


Fig.4 correlazione tra percentuale dei neutrofili all'inizio studio nei pazienti BPCO e caduta del FEV1 dopo 5 anni.

La percentuale degli eosinofili nello sputo dei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa e la percentuale di neutrofili nell'espettorato dei pazienti con BPCO erano in grado di predire in maniera significativa un accelerato declino della funzionalità respiratoria nel tempo. In particolare nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa una percentuale di eosinofili nell'espettorato documentata all'inizio dello studio superiore al 6.1% predice una rapida caduta del FEV1 a distanza di 5 anni, viceversa nei pazienti con BPCO una percentuale di neutrofili nell'espettorato superiore al 77.3% documentata all'inizio dello studio predice una significativa di caduta di FEV1 a distanza di 5 anni.

Riacutizzazioni

Durante i 5 anni di follow up il numero di riacutizzazioni in entrambi i gruppi, di entità tale da richiedere un intervento medico era pari a 361, di cui 15 eventi richiedevano ospedalizzazione. Il valore medio delle riacutizzazioni paziente/anno non era differente tra il gruppo di asma bronchiale con ostruzione fissa (1.41 ± 0.26) e BPCO (1.98 ± 0.3), mentre era significativamente maggiore comunque rispetto ai pazienti asmatici con ostruzione bronchiale completamente reversibile (0.53 ± 0.11): la percentuale di ricoveri per riacutizzazioni di BPCO era superiore rispetto alla percentuale di riacutizzazioni per asma bronchiale con ostruzione fissa (6.2% vs 1.7% del totale del numero delle riacutizzazioni; $p = .07$).

Inoltre, la percentuale degli eosinofili nell'espettorato documentata all'inizio dello studio nei pazienti con asma bronchiale con ostruzione fissa, correla direttamente con il numero di riacutizzazioni/anno registrate. ($p < 0.01$, $r = 0,79$). Viceversa, la percentuale dei neutrofili nell'espettorato documentata all'inizio dello studio nei pazienti con BPCO, correla direttamente con il numero delle riacutizzazioni/anno registrate ($p < 0.05$, $r = 0.53$) (fig.5,6).

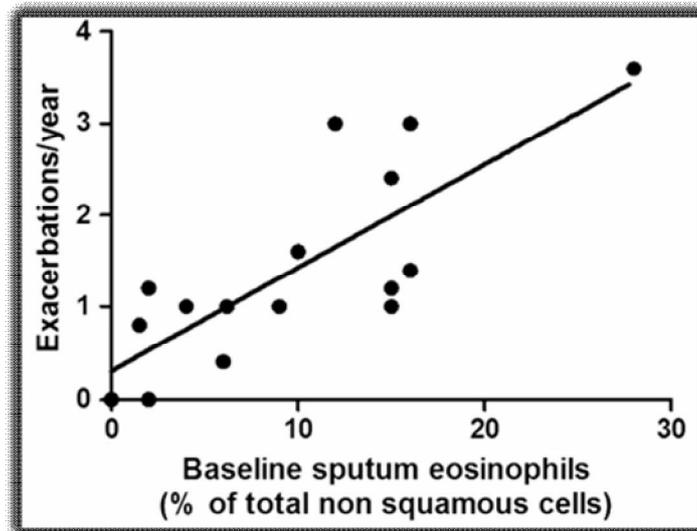


Fig. 5: Correlazione tra percentuale eosinofili nello sputo e numero riacutizzazioni/anno nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa

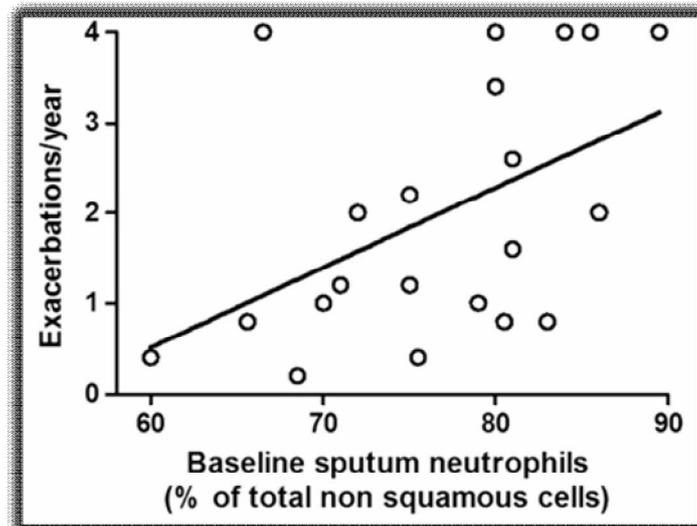


Fig.6 correlazioni tra % neutrofili nello sputo all'inizio dello studio e numero riacutizzazioni/anno nei pazienti con BPCO.

La percentuale degli eosinofili nell'espettorato all'inizio dello studio nei pazienti con asmatici con ostruzione bronchiale fissa e la percentuale di neutrofili nello sputo all'inizio dello studio nei pazienti BPCO predice l'aumento della frequenza delle riacutizzazioni/anno.

Discussione

In questo studio abbiamo dimostrato che anche a distanza di cinque anni i pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa presentano caratteristiche infiammatorie e funzionali diverse rispetto ai pazienti BPCO. L'ostruzione bronchiale fissa porta ad un aumento della caduta della funzionalità respiratoria e ad un aumento della frequenza delle riacutizzazioni sia in pazienti con asma bronchiale con ostruzione bronchiale fissa che BPCO. Precedenti studi in letteratura hanno mostrato una rapida caduta della funzionalità respiratoria dei pazienti asmatici rispetto ai soggetti sani [134, 135] così come anche la caduta del FEV1 nei pazienti BPCO è stata ampiamente descritta [136, 137]. Tuttavia, nessun studio precedente aveva confrontato il declino della funzionalità respiratoria in pazienti con storia clinica di asma bronchiale o BPCO che condividono un simile grado di ostruzione. Questo studio mostra che la presenza di un ostruzione bronchiale fissa potrebbe essere una chiave prognostica importante. Infatti pazienti asmatici di simili età, con ostruzione bronchiale reversibile hanno una caduta di funzionalità respiratoria inferiore rispetto ai pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa. In uno studio epidemiologico classico Barrows et al [126], mostrarono che pazienti con ostruzione del flusso aereo che riportavano loro stessi come "asmatici cronici bronchitici" avevano un declino del FEV1 inferiore rispetto ai pazienti fumatori con simile ostruzione del flusso aereo ma non storia di asma bronchiale. Le differenze tra lo studio di Barrows e il nostro studio sono evidenti (es: nello studio di Barrows la diagnosi non era clinica ma era riportata dal paziente stesso, i criteri di arruolamento e la definizione di bronchite asmatica cronica era diversa rispetto alla definizione nel nostro studio di ostruzione bronchiale fissa) e queste potrebbero anche spiegare le discrepanze.

Abbiamo osservato che sia nell'asma bronchiale con ostruzione fissa che nella BPCO a distanza di cinque anni si assiste ad una significativa riduzione del FEV1. Questo dato potrebbe trovare spiegazione nel fatto che l'infiammazione persistente porta ad un rimodellamento delle vie aeree con conseguenti alterazioni strutturali sia a carico delle vie aeree che del parenchima polmonare, responsabili a loro volta dell'ostruzione bronchiale fissa e del progressivo declino del FEV1.

Nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa la percentuale degli eosinofili nello sputo all'inizio dello studio correla direttamente con la caduta del FEV1 a distanza di 5 anni. Questo dato conferma che l'eosinofilia nello sputo è un fattore determinante non solo dello sviluppo ma anche del mantenimento di una persistente limitazione del flusso aereo.

Nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa abbiamo trovato una correlazione positiva tra il numero degli eosinofili all'inizio dello studio e la frequenza delle

riacutizzazioni. Abbiamo inoltre trovato che la conta delle cellule infiammatorie nell'espettorato documentata all'inizio dello studio (eosinofili nei pazienti con asma e neutrofilo nei pazienti con BPCO) sono in grado di predire la caduta della funzionalità respiratoria.

La persistenza dell'infiammazione eosinofila nonostante il trattamento regolare con glucocorticoidi per via inalatoria suggerisce che i pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa siano refrattari al trattamento con glucocorticoidi per via inalatoria. La scarsa risposta porta ad infiammazione persistente che di conseguenza potrebbe contribuire all'accelerato declino della funzionalità respiratoria che si osserva nei pazienti asmatici con ostruzione bronchiale fissa [125]. E' anche possibile che l'ostruzione bronchiale fissa si sviluppa nei pazienti asmatici refrattari ai glucocorticoidi per via inalatoria tramite infiammazione non controllata delle vie aeree portando a modifiche strutturali e limitazione persistente delle vie aeree.

Vi è evidenza scientifica che i neutrofilo delle vie aeree aumentano progressivamente al peggioramento della funzionalità respiratoria nei pazienti con BPCO [138, 139]. Soprendentemente nel nostro studio la percentuale dei neutrofilo nello sputo correla anche con il numero delle riacutizzazioni ed in linea con studi recenti [140] abbiamo trovato che maggiore è il numero delle riacutizzazioni, piu' rapido è il declino del FEV1.

Queste osservazioni valutate insieme suggeriscono che vi è una stretta correlazione tra riacutizzazioni, conta dei neutrofilo e declino della funzionalità respiratoria nei pazienti BPCO: pazienti con frequenti riacutizzazioni hanno ripetuti richiami di neutrofilo nelle vie aeree e di conseguenza maggiore tendenza ad una rapida caduta della funzionalità respiratoria. I dati ottenuti dal nostro studio riguardano un numero limitato di pazienti per cui questi risultati necessitano di essere confermati in una popolazione di studio piu' ampia. Il nostro studio comunque ha solo iniziato a compiere un passo rilevante nella medicina respiratoria: la necessità di ulteriori informazioni in una popolazione rilevante di pazienti asmatici che è stata lasciata in disparte dagli studi clinici. La attenta caratterizzazione della coorte originale dei pazienti che è stata seguita in 5 anni, è una dei punti piu' forti di questo studio, che ci ha permesso di smascherare l'importanza dell'ostruzione bronchiale fissa in una prospettiva prognostica che porta verso l'orizzonte di BPCO. Le strategie terapeutiche dovrebbero essere indirizzate a differenziare i target cellulari, gli aspetti patogenetici o entrambi, in tutte e due le malattie croniche.

4.2 Caratteristiche cliniche e funzionali della BPCO stabile: correlazione con i parametri dell'espettorato

Solide evidenze documentano un aumento dell'infiammazione a livello delle vie aeree di pazienti con BPCO in corso di riacutizzazione rispetto alla condizione di stabilità [141] e un aumento dell'infiammazione negli stadi più severi rispetto agli stadi più lievi [142]. Per analogia si può speculare che il peggioramento dei sintomi nella BPCO sia legato a variazioni quali/quantitative della infiammazione bronchiale. La terapia della BPCO si basa sull'impiego di broncodilatatori e corticosteroidi inalatori.

Non è stato sino ad oggi valutato se un aumento dei sintomi si associ ad un aumento/modificazione dell'infiammazione delle vie aeree. Tale evidenza costituirebbe il logico razionale a progetti clinici rivolti a valutare l'uso al bisogno, associati ai bronco dilatatori, di farmaci antinfiammatori (corticosteroidi) assunti per via inalatoria nei pazienti con BPCO.

Scopo dello studio è valutare se, in condizioni di stabilità, esistano correlazioni tra:

- 1) l'entità/intensità dell'infiammazione presente a livello delle vie aeree in pazienti con BPCO (cellule infiammatorie nell'espettorato, NO nell'aria espirata), i sintomi (dispnea, tosse, espettorato, uso di salbutamolo al bisogno) e la funzionalità respiratoria.
- 2) la variazione dell'infiammazione presente a livello delle vie aeree di pazienti con BPCO (misurata in termini di variazione del numero e del tipo di cellule infiammatorie nell'espettorato e variazioni dei livelli di NO nell'aria espirata), variazione dei sintomi (dispnea, tosse, espettorato, uso di salbutamolo al bisogno) e variazione della funzionalità respiratoria (PEF del mattino, PEF della sera, FEV1).

Pazienti inclusi nello studio

Sono stati inclusi nello studio pazienti fumatori o ex fumatori con una storia di fumo di almeno 15 pack/years, di entrambi i sessi, di età compresa tra i 40-75 anni, con test cutanei negativi per i comuni allergeni e con diagnosi di BPCO in accordo con le linee guida internazionali in fase di stabilità clinica da almeno 8 settimane. Durante lo studio non è stata modificata la terapia inalatoria che il paziente assumeva regolarmente a domicilio prima allo studio. I pazienti sono stati istruiti a non assumere la terapia inalatoria del mattino e broncodilatatori a breve durata la mattina della visita.

Disegno dello studio

I pazienti sono stati monitorati per 4 settimane e visitati ogni 7 giorni. I dati di 160 settimane sono stati complessivamente disponibili per l'analisi. Ad ogni visita i pazienti sono stati sottoposti a valutazione clinica con raccolta dei parametri vitali, esame funzionale respiratorio, misura dei livelli di ossido nitrico (NO) nell'aria espirata e raccolta dell'espettorato indotto per lo studio delle cellule infiammatorie e mediatori dell'infiammazione. I pazienti sono stati invitati a compilare a domicilio un diario clinico dei sintomi [che tiene conto della dispnea (mMRC dyspnea scale), presenza di tosse, presenza di espettorato, uso di broncodilatatori al bisogno] ed a eseguire la misurazione del picco di flusso (PEF) sia al mattino che alla sera. Alla visita conclusiva ai pazienti è stato chiesto di compilare il Saint George Respiratory Questionnaire per valutare la qualità di vita. I pazienti che durante le quattro settimane dello studio manifestavano una riacutizzazione (peggioramento dei sintomi tali da richiedere un intervento con antibiotici e corticosteroidi per via sistemica) sono usciti dallo studio.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico di Ferrara nella seduta di luglio 2008 e la Direzione Sanitaria dell'Arcispedale S. Anna di Ferrara - presso il quale lo studio si è svolto ha dato autorizzazione allo svolgimento in data 7 ottobre 2008. Lo studio è stato registrato al sito Clinicaltrials.gov (numero: NCT01216592). I pazienti prima di iniziare lo studio hanno firmato modulo informativo e di consenso alla partecipazione allo studio stesso.

Risultati

Pazienti che hanno completato lo studio.

Quaranta pazienti hanno completato lo studio. I dati descrittivi della popolazione sono riportati in tabella sottostante.

Pazienti in terapia con corticosteroidi per via inalatoria (n)	18/40
Età (anni)	68.9±3.9
Sesso (M/F)	26/14
Abitudine tabagica (pack/years)	46±7.9
FEV1/FVC	56.4±1.4
FEV1 post-bronchodilator (litri)	1.49±0.15
FEV1 post-bronchodilator (%)	57.2±3.1

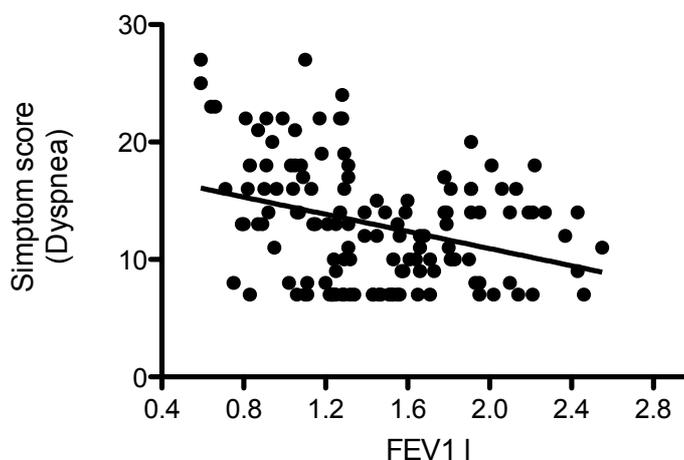
Paziente che hanno interrotto lo studio poiché hanno manifestato una riacutizzazione.

Un paziente è uscito dallo studio in quanto ha manifestato una riacutizzazione durante la prima settimana dello studio. Due pazienti hanno manifestato una riacutizzazione durante la terza settimana di studio.

Numero di pazienti	3
Età (anni)	68±2.1
Sesso (M/F)	3/0
Abitudine tabagica (pack/years)	36.6±3.3
FEV1/FVC	56.0±2.1
FEV1 post-bronchodilator (litri)	1.54±0.05
FEV1 post-bronchodilator (%)	52.3±2.2
Pazienti in terapia con corticosteroidi per via inalatoria (n)	2/3

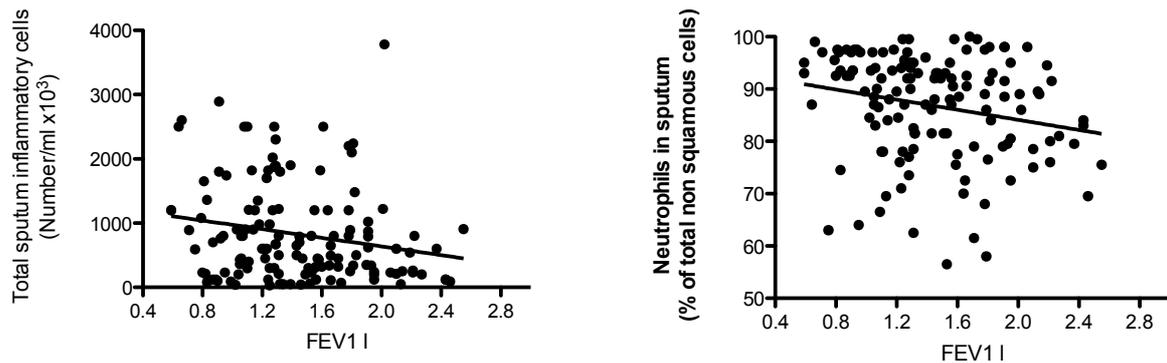
Correlazione tra funzione e sintomi

Non è stata trovata alcuna correlazione statisticamente significativa tra sintomi totale e funzionalità respiratoria ($p>0.05$); tosse e funzionalità respiratorie ($p>0.05$) e uso di Salbutamolo al bisogno e funzionalità respiratori ($p>0.05$). E' stata evidenziata una correlazione negativa statisticamente significativa tra dispnea e funzionalità respiratoria ($p<0.001$, $r = -0.32$; vedi figura sottostante)



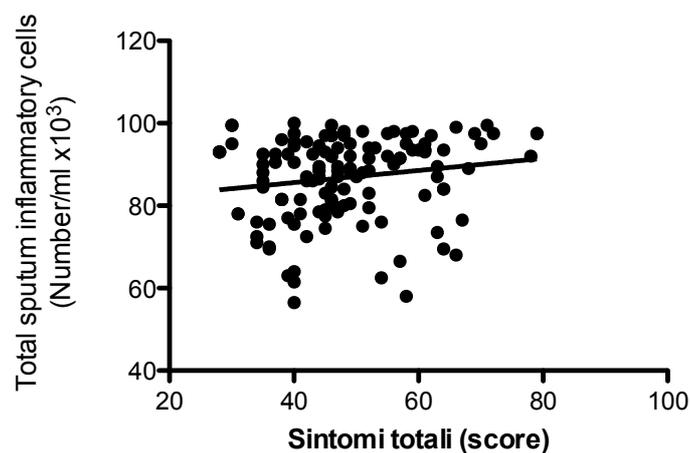
Correlazione tra funzione ed infiammazione

Sono state trovate correlazioni negative statisticamente significative, seppur deboli, tra funzionalità respiratoria e rispettivamente sia cellule infiammatorie totali ($p < 0.05$; $r = -0.20$) nell'espettorato che neutrofilii ($p < 0.05$; $r = -0.21$) (vedi figura sottostante). Non è stata evidenziata alcuna correlazione statisticamente significativa tra funzione respiratoria ed eosinofili e macrofagi nell'espettorato.

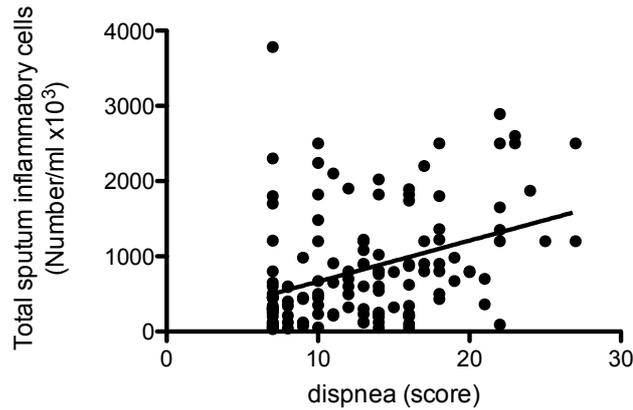


Correlazione tra infiammazione e sintomi

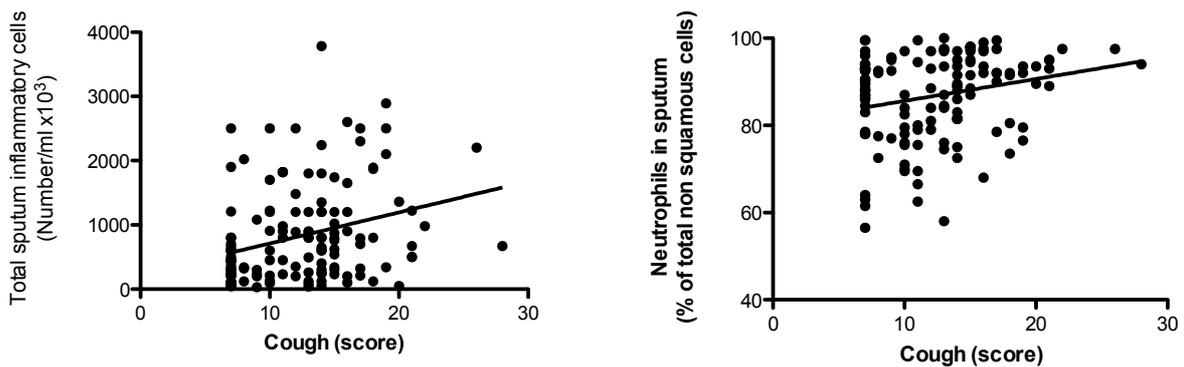
E' stata trovata una correlazione positiva statisticamente significativa tra sintomi totale e cellule infiammatorie totali nell'espettorato ($p < 0.001$; $r = 0.43$ - vedi figura sottostante). Nessuna correlazione statisticamente significativa tra sintomi totale e singole componenti cellulari infiammatorie dell'espettorato.



E' stata trovata una correlazione positiva statisticamente significativa tra dispnea e cellule infiammatorie totali nell'espettorato ($p < 0.001$; $r = 0.37$ - vedi figura sottostante). Deboli correlazioni ma statisticamente significative sono state trovate tra la dispnea e rispettivamente i neutrofilii ($p < 0.001$; $r = 0.29$) e gli eosinofili ($p < 0.05$; $r = 0.19$) nell'espettorato.



E' stata trovata una correlazione positiva statisticamente significativa tra tosse e cellule infiammatorie totali nell'espettorato ($p < 0.001$; $r = 0.29$) e tra tosse e neutrofili ($p < 0.001$; $r = 0.23$) nell'espettorato (vedi figura sottostante). Non è stata trovata alcuna correlazione statisticamente significativa tra tosse e altre componenti infiammatorie nell'espettorato.

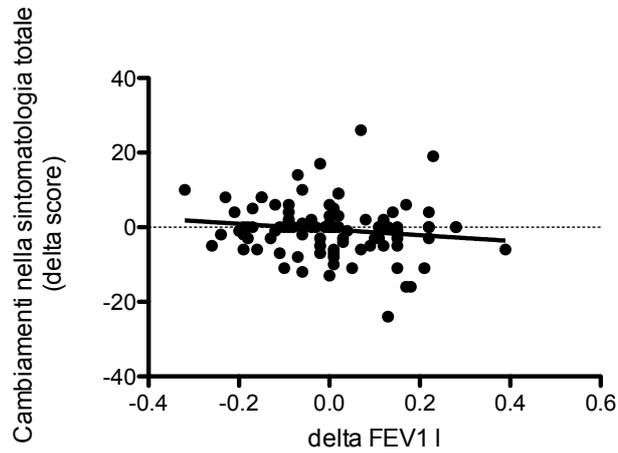


Deboli, ma statisticamente significative, correlazioni positive sono state trovate tra uso di Salbutamolo e rispettivamente cellule infiammatorie totali ($p < 0.001$; $r = 0.28$) ed eosinofili ($p < 0.05$; $r = 0.21$) nell'espettorato. Non è stata trovata alcuna correlazione statisticamente significativa tra uso di Salbutamolo e altre componenti infiammatorie nell'espettorato.

Non è stata trovata alcuna correlazione statisticamente significativa tra espettorato e sia cellule infiammatorie totali che con le singole componenti infiammatorie dell'espettorato.

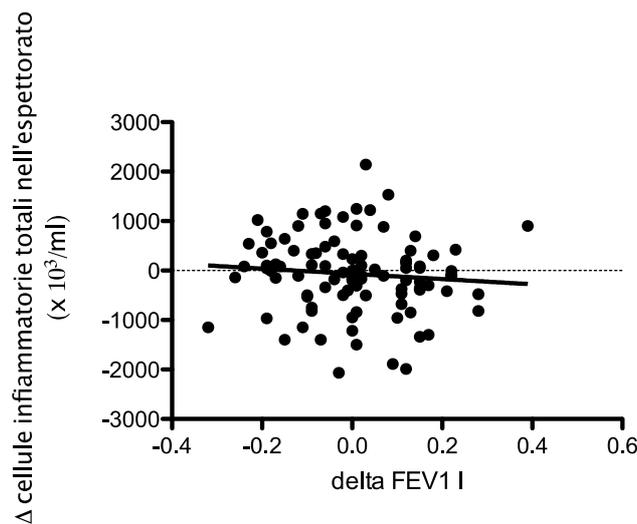
Correlazioni tra modificazioni della funzione e dei sintomi respiratori

Non è stata evidenziata nessuna correlazione statisticamente significativa tra cambiamenti della funzionalità respiratoria e cambiamenti dei sintomi totali (vedi figura sottostante) o singoli componenti della sintomatologia (dispnea, tosse, espettorato uso di salbutamolo).



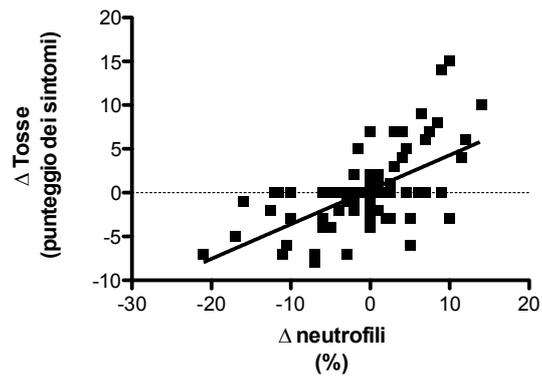
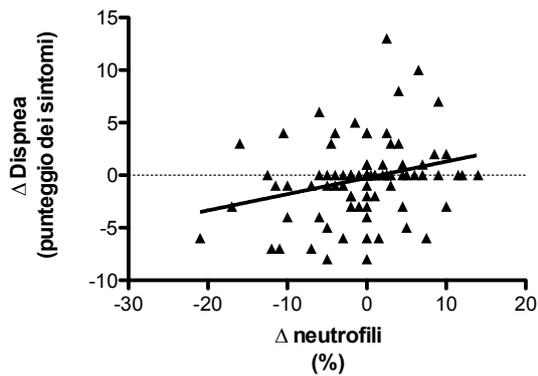
Correlazioni tra modificazioni della funzione respiratoria e dell'inflammazione

Non è stata evidenziata nessuna correlazione statisticamente significativa tra cambiamenti della funzionalità respiratoria e cambiamenti delle cellule infiammatorie totali (vedi figura sottostante) o singoli componenti infiammatorie (neutrofili, eosinofili, macrofagi, linfociti) dell'espettorato.

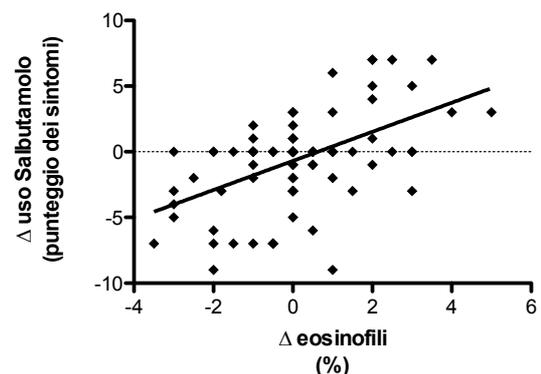
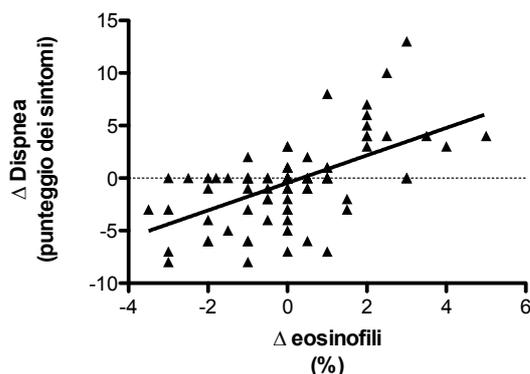


Correlazioni tra modificazione dell'inflammazione e dei sintomi respiratori

Non è stata evidenziata una correlazione tra cambiamenti della sintomatologia totale e cambiamenti della percentuale di neutrofili nell'espettorato. Una correlazione statisticamente significativa, seppur debole, è stata trovata tra aumento della dispnea e cambiamenti della percentuale di neutrofili nell'espettorato ($p < 0.01$; $r = 0.26$). Una solida e significativa correlazione positiva è stata trovata tra cambiamenti del punteggio della tosse e cambiamenti della percentuale di neutrofili nell'espettorato ($p < 0.001$; $r = 0.59$) (vedi figura sottostante).



E' stata trovata una correlazione statisticamente significativa, seppure debole, tra cambiamento dei sintomi totali e cambiamenti degli eosinofili nell'espettorato ($p < 0.01$; $r = 0.25$) ed una correlazione tra sia i cambiamenti della dispnea ed i cambiamenti della percentuale di eosinofili nell'espettorato ($p < 0.001$; $r = 0.57$) che tra i cambiamenti del punteggio relativi all'uso di Salbutamolo ed i cambiamenti della percentuale di eosinofili nell'espettorato ($p < 0.001$; $r = 0.51$) (vedi figura sottostante)



Conclusioni

Deboli, seppure significative, correlazioni sono state trovate tra la severità dell'ostruzione bronchiale e sia la severità della sintomatologia totale che l'infiammazione totale delle vie aeree dei pazienti con BPCO. Solide e significative correlazioni sono state trovate tra cambiamenti di singoli parametri della sintomatologia considerata e singoli componenti della infiammazione delle vie aeree. In particolare un aumento dei neutrofilii si associa ad un aumento della sintomatologia tussigena, mentre l'aumento della dispnea e dell'uso di Salbutamolo al bisogno si associa ad un aumento della componente eosinofila nell'espettorato. Studi futuri saranno necessari per valutare se la modulazione della terapia sia in termini di posologia che in termini di classi farmaceutica in base ai cambiamenti della sintomatologia respiratoria possa consentire una migliore gestione dei pazienti con BPCO.

4.3 Terapia della Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO): effetto del trattamento cronico con corticosteroidi di inalatori sulla colonizzazione delle vie aeree

Introduzione

I corticosteroidi inalatori (ICS) sono comunemente utilizzati nel trattamento della BPCO e le ultime linee guida ne raccomandano l'uso nei pazienti con malattia grave-molto grave e storia di frequenti riacutizzazioni (una o più all'anno negli ultimi tre anni). Pertanto ci sono evidenze che i corticosteroidi inalatori possano ridurre gli eventi di riacutizzazione della malattia, per lo più ad eziologia infettiva.

Tuttavia, recenti studi prospettici, di grandi dimensioni, hanno riportato un aumento dell'incidenza dei casi di polmonite in pazienti con BPCO che assumono regolarmente ICS, sollevando preoccupazioni riguardo il loro utilizzo.

Alcuni studi, infatti, hanno evidenziato un'aumentata mortalità nei pazienti con BPCO con polmonite acquisita in comunità (CAP) ospedalizzati o ancor meglio ricoverati presso un reparto di terapia intensiva, rispetto a soggetti senza BPCO [147, 148].

Nonostante questo, il legame tra corticosteroidi inalatori e polmonite rimane controverso e, accanto a studi clinici e sperimentali che sottolineano questa associazione, ve ne sono altri che invece ne evidenziano i limiti.

In particolare, essendo le polmoniti eventi infettivi, non è noto se i corticosteroidi inalatori possano promuoverle, facilitando l'aumento della carica microbica nelle vie aeree.

Corticosteroidi inalatori e rischio di polmonite: pro e contro

Dati a favore

Il fattore nucleare di trascrizione KB (NF-KB) è ubiquitariamente espresso e gioca un ruolo chiave nell'espressione di geni pro-infiammatori, legati alla sintesi di citochine (ad es. TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), molecole di adesione (ad es. ICAM-1, VCAM-1) e chemochine (ad es. eotassina, IL-8).

Il legame di NF-KB al DNA è bloccato dall'azione di proteine inibitrici (IKB) e, uno degli effetti dei corticosteroidi, è aumentare l'espressione delle IKB e, quindi, inibire la via dell'NF-KB.

I pazienti con BPCO, nelle vie aeree, hanno un elevato livello dei markers della via dell'NF-KB e questo è implicato nell'evoluzione della malattia. Quindi, l'uso dei corticosteroidi

inalatori sembra una logica strategia terapeutica. Tuttavia, l'inibizione di NF-KB nei pazienti con BPCO può comportare la soppressione della risposta benefica dell'ospite verso i microrganismi patogeni.

Infatti, l'NF-KB sembra avere un ruolo importante nella risposta dell'organismo nei confronti dell'infezione da Pneumococco (il più frequente agente eziologico delle polmoniti acquisite in comunità) [149].

È stato dimostrato, attraverso studi condotti su animali, che lo Pneumococco stimola la via dell'NF-KB e che la distruzione mirata genetica della subunità p-50 dell'NF-KB nei topi aumenta la suscettibilità all'infezione stessa pneumococcica [150,151].

In conclusione, quindi, l'effetto inibitorio dei corticosteroidi inalatori sulla via dell'NF-KB potrebbe essere una plausibile spiegazione per l'aumentato rischio di polmonite associato al loro utilizzo.

Tre ampi studi randomizzati, in doppio cieco, hanno dimostrato un'aumentata frequenza della polmonite nei pazienti con BPCO in trattamento con fluticasone propionato, da solo o in associazione, rispetto ai pazienti in trattamento con altre terapie inalatorie o con placebo.

In particolare, Calverley et al [152], hanno confrontato quattro gruppi di pazienti con BPCO (circa 8500 persone in totale), rispettivamente trattati, per un periodo di tre anni, con: salmeterolo + fluticasone (50 + 500 µg), salmeterolo da solo, fluticasone da solo e placebo.

Lo studio non ha evidenziato una significativa differenza di mortalità, per qualsiasi causa, tra i vari gruppi (forse perchè è sottodimensionato per rilevare questo effetto che, comunque, è presente), mentre ha rilevato una riduzione significativa della frequenza delle riacutizzazioni, un miglioramento dello stato di salute (valutato attraverso il questionario di St. George) e dei valori spirometrici nel gruppo trattato con terapia combinata rispetto agli altri.

La polmonite, come evento avverso, è risultata essere più frequente nei pazienti in terapia con fluticasone, da solo o in combinazione, rispetto al placebo (rispettivamente il 18,3% e il 19,6% rispetto al 12,3%).

Kardos et al [153], hanno, invece, confrontato due gruppi di pazienti con BPCO (circa 990 persone complessivamente), rispettivamente trattati, per un periodo di 44 settimane, con: salmeterolo + fluticasone (50 + 500 µg) e salmeterolo da solo.

La terapia combinata riduce significativamente la frequenza delle riacutizzazioni, migliora lo stato di salute, il picco di flusso espiratorio (PEF) e l'uso di farmaci d'emergenza.

Anche in questo caso, la polmonite, come evento avverso, è risultata essere più frequente nel primo, rispetto al secondo gruppo.

Wedzicha et al [154], hanno, infine, confrontato due gruppi di pazienti con BPCO (circa 1300

persone in tutto), rispettivamente trattati, per un periodo di due anni, con: salmeterolo + fluticasone (50 + 500 µg) e tiotropio (18 µg).

Non è stata evidenziata alcuna differenza nella frequenza delle riacutizzazioni tra i due gruppi, anche se molti pazienti in trattamento con tiotropio hanno abbandonato preventivamente lo studio. Le riacutizzazioni che richiedono terapia antibiotica sono risultate essere più frequenti nel primo gruppo, quelle che richiedono corticosteroidi sistemici nel secondo. Quindi, probabilmente, il trattamento può influenzare più il tipo, ovvero l'eziologia, delle riacutizzazioni, che la loro frequenza.

Anche in questo studio, la polmonite, come evento avverso, è più frequente nel primo, rispetto al secondo gruppo.

In un recente studio [70], è emerso che la carica batterica nelle vie aeree, nella BPCO stabile, nel corso del tempo (un anno di follow-up), aumenta.

In questo studio, la quasi totalità dei pazienti (28/30) era in trattamento cronico con ICS, suggerendo che i corticosteroidi inalatori potrebbe promuovere o facilitare la colonizzazione batterica delle vie aeree nei pazienti con BPCO.

Dati contro

Due recenti revisioni, che hanno incluso questi tre studi e altri minori, i quali confrontano il trattamento con un qualsiasi corticosteroide inalatorio con uno di controllo, per almeno sei mesi, e che riportano la polmonite come evento avverso, hanno concluso che la terapia con corticosteroidi inalatori è significativamente associata ad un aumentato rischio di polmonite, ma non ad un aumento della mortalità per qualsiasi causa [155,156].

Queste revisioni hanno, inoltre, cercato di evidenziare i limiti degli studi presi in esame, limiti che attualmente costituiscono la base principale contro l'associazione tra corticosteroidi inalatori e polmonite.

Una delle critiche principali è che nessuno di questi studi è stato disegnato specificamente per valutare il rischio di polmonite, quindi non viene utilizzata una definizione oggettiva di polmonite, ovvero manca la conferma radiografica e la diagnosi è sempre solamente clinica. Ma, spesso, clinicamente, la polmonite si sovrappone ed è difficilmente distinguibile da una riacutizzazione; da questo può derivare la riduzione della frequenza delle riacutizzazioni e l'aumento dei casi di polmonite, evidenziato dai diversi studi.

Altri limiti rilevanti sono la grande eterogeneità nella popolazione studiata e tra tipo e dose di corticosteroidi inalatori utilizzati. Da questo potrebbe dipendere l'effetto neutro sulla mortalità, complessivamente ricavato.

Infatti, perchè se la polmonite è una causa importante di morte nei pazienti con BPCO, la sopravvivenza non è ridotta con l'utilizzo dei corticosteroidi inalatori, che abbiamo detto determinano un maggior numero di casi di polmonite?

Forse perchè alcune popolazioni possono trarne beneficio, altre no, determinando però, globalmente, nessuna differenza di sopravvivenza; o forse perchè l'effetto può variare in base al tipo e alla dose di corticosteroide utilizzato.

Una recente meta-analisi condotta da Sin et al [157], ha evidenziato che il trattamento, per via inalatoria, con budesonide (320-1280 µg/giorno), un corticosteroide meno potente del fluticasone propionato, per 12 mesi, non comporta un aumento dei casi di polmonite, sempre considerata come evento avverso.

Ernst et al [158], hanno condotto uno studio caso-controllo su una coorte di soggetti sul periodo dal 1988 al 2003. Questo studio ha dimostrato che, tra i pazienti anziani (con più di 65 anni) con BPCO, l'uso di corticosteroidi inalatori è associato ad un elevato rischio d'ospedalizzazione per polmonite, e che il tasso d'ospedalizzazione per questa complicanza è maggiore con la dose più alta di ICS, cioè con fluticasone al dosaggio di 1 µg/giorno o più.

Esistono degli studi sperimentali, condotti in vitro e in modelli animali, che non evidenziano il presunto legame tra ICS e polmonite, anzi suggeriscono che i corticosteroidi inalatori possano ridurre il rischio di infezioni batteriche e di polmonite.

Alcuni studi, utilizzando colture di cellule epiteliali respiratorie, hanno dimostrato che la pre-incubazione del tessuto, ricavato da soggetti sani, con fluticasone propionato determina una significativa riduzione nell'invasione dell'epitelio da parte dei comuni batteri patogeni come *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*.

Studi condotti su animali da esperimento hanno, inoltre, mostrato che il trattamento con fluticasone propionato, per via inalatoria, riduce significativamente l'invasione da *M. pneumoniae* del tessuto polmonare e sopprime l'infiammazione polmonare.

Conclusioni simili sono state ricavate in un modello animale di polmonite pneumococcica, nel quale la somministrazione di fluticasone riduce l'invasione polmonare da parte dello *Pneumococco* di almeno il 50% a 24 e a 48 ore dall'infezione stessa [149].

Nel loro complesso, gli studi realizzati fino a questo momento evidenziano che il trattamento cronico con corticosteroidi inalatori associati ad un broncodilatatore a lunga durata d'azione, nei pazienti con BPCO grave-molto grave e frequenti riacutizzazioni, riduce la frequenza delle riacutizzazioni, che sono eventi, nella maggior parte dei casi, di natura infettiva.

Alcuni studi, d'altra parte, dimostrano che lo stesso trattamento sembra aumentare l'incidenza dei casi di polmonite, che rappresenta comunque un evento infettivo.

Pertanto emerge un apparente paradosso: da un lato il trattamento regolare con corticosteroidi inalatori aumenta il rischio di infezioni del tratto respiratorio (polmonite), dall'altro riduce la frequenza delle riacutizzazioni, ugualmente considerate, nella maggior parte dei casi, di natura infettiva.

Sono necessari, quindi, ulteriori studi per valutare l'effetto del trattamento con corticosteroidi inalatori sulla crescita batterica nelle vie aeree dei pazienti con BPCO.

Scopo dello studio

L'obiettivo primario di questo studio è valutare l'andamento della carica batterica, nell'espettorato di due gruppi di pazienti affetti da BPCO, durante il trattamento rispettivamente con l'associazione tra un corticosteroide inalatorio ed un broncodilatatore a lunga durata d'azione e con un broncodilatatore a lunga durata d'azione da solo e di valutarne l'andamento in corso di riacutizzazione.

Materiali e metodi

Pazienti dello studio

Lo studio è stato condotto su pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva di grado moderato (ovvero in secondo stadio, secondo le linee guida GOLD), che necessitano, in accordo con le linee guida internazionali, di un trattamento cronico con broncodilatatori a lunga durata d'azione.

Si tratta di pazienti con un rapporto tra il volume espiratorio forzato nel primo secondo e la capacità vitale forzata (FEV1/CVF) inferiore a 0,7 dopo 30 minuti dalla somministrazione per via inalatoria di 400 mcg di salbutamolo e con un valore percentuale del FEV1 post-broncodilatatore, rispetto al valore teorico, compreso tra il 50% e l'80%.

I criteri di esclusione considerati sono:

- terapia con corticosteroidi nei quattro mesi precedenti l'inizio dello studio;
- anamnesi positiva per atopia (asma e/o rinite allergica);
- presenza di concomitanti patologie polmonari (ad esempio bronchiectasie o neoplasia polmonare);
- un'infezione acuta del tratto respiratorio, incluse le riacutizzazioni della BPCO, nei tre mesi precedenti l'inizio dello studio.

Disegno dello studio

Sono stati reclutati per lo studio 31 pazienti con BPCO, diagnosticata secondo le recenti linee guida internazionali, di grado moderato.

Questi 31 pazienti sono stati randomizzati in due gruppi.

Il primo gruppo di pazienti (gruppo sperimentale) è stato trattato con la terapia combinata salmeterolo + fluticasone (50 + 500 µg), somministrata due volte al giorno attraverso un dispositivo predosato per via inalatoria (Diskus); il secondo gruppo (gruppo di controllo) con salmeterolo da solo (50 µg), sempre due volte al giorno, via Diskus.

Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato approvato dal Comitato Etico locale prima di iniziare lo studio. La durata dello studio è stata di sei mesi e sono state effettuate tre visite, al tempo zero (baseline), a tre mesi e a sei mesi.

Ad ogni visita il paziente è stato sottoposto ad una valutazione clinica con raccolta dei parametri vitali, esame funzionale respiratorio e raccolta dell'espettorato indotto o spontaneo per lo studio microbiologico (analisi quantitativa e qualitativa, ovvero valutazione della carica batterica e del tipo di batteri isolati) e delle cellule infiammatorie.

Ai pazienti è stato riferito di contattare il Centro di Ricerca sull'asma e sulla BPCO per una visita non programmata, nel caso di una riacutizzazione della malattia (definita in base alle linee guida GOLD come "un evento, nella storia naturale della malattia, caratterizzato da un cambiamento nei sintomi di base del paziente, cioè dispnea, tosse e/o espettorazione, oltre le normali variazioni giornaliere, ad esordio acuto, che può giustificare una modificazione della regolare terapia di base del paziente") che insorga durante il periodo di studio. Se clinicamente viene sospettata una polmonite, i pazienti vengono sottoposti ad una radiografia del torace. In fase acuta, i pazienti sono trattati secondo le linee guida. La visita successiva viene fissata almeno 10 settimane dopo la riacutizzazione.

Prove di funzionalità respiratoria

I pazienti sono stati sottoposti ad indagine funzionale respiratoria (spirometria) secondo linee guida standardizzate. Il FEV1 e la FVC sono stati misurati prima e dopo 15 minuti dall'inalazione di 400 µg di Salbutamolo.

Raccolta e processazione dell'espettorato indotto o spontaneo

La raccolta dell'espettorato è stata eseguita con gli stessi metodi precedentemente descritti nella sperimentazione 4.1.

Esame microbiologico

La parte rimanente dell'espettorato è stata sottoposta all'esame microbiologico, presso il laboratorio di Microbiologia dell'ospedale di Ferrara, secondo la seguente procedura. L'espettorato è stato trattato con ditiotreitolo (un mucolitico che permette di ottenere un campione contenente batteri uniformemente distribuiti, evitando il rischio che microrganismi importanti non vengano evidenziati, in quanto concentrati in una piccola parte del campione); è, quindi, stato preparato un vetrino, utilizzando la colorazione di Gram, che è stato sottoposto all'esame microscopico per valutare l'idoneità o meno del campione per la semina (ovvero se vi fosse o meno un'eccessiva contaminazione da parte della saliva e, quindi, da parte della flora saprofitica orofaringea) e per valutare la presenza o meno di batteri o miceti, descrivendo i morfotipi presenti.

Il campione viene considerato idoneo per la semina se, all'esame microscopico, ad un ingrandimento 10X, vengono riscontrate meno di 25 cellule epiteliali di sfaldamento per campo. Se vengono riscontrate, invece, più di 25 cellule epiteliali di sfaldamento per campo, il campione non viene considerato idoneo (cioè rappresentativo delle vie aeree inferiori) e non si procede con la semina. Sempre all'esame microscopico, però ad un ingrandimento maggiore (100X), sono stati valutati i morfotipi dei germi presenti, per un'identificazione presuntiva dei microrganismi presenti, che può guidare l'esame colturale successivo.

I terreni standard, che sono stati seminati per l'identificazione dei principali microrganismi patogeni, sono:

- l'agar sangue per i cocci gram positivi come lo *S. aureus*, lo *S. pneumoniae*, lo *S. pyogenes*;
- l'agar cioccolato per gli emofili (*H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*) e i cocci gram negativi come la *Moraxella catarrhalis*;
- l'agar MacConkey per i bacilli gram negativi ossidasi negativi (cioè le Enterobacteriaceae come l'*E. coli*)

I bacilli gram negativi non fermentanti, come lo *Pseudomonas aeruginosa*, crescono su qualsiasi terreno primario.

Per la valutazione della carica batterica, le piastre sono state seminate utilizzando la tecnica delle tre zone, ovvero vengono depositati 20 µl del campione e strisciati cinque volte avanti e indietro, girando la piastra tre volte. Si valuta, quindi, il numero di colonie per quadrante e, in base a questo, viene stimata approssimativamente la carica in CFU (unità formanti colonie) / ml, secondo la tabella riportata di seguito.

Nro colonie I quadrante	Nro colonie II quadrante	Nro colonie III quadrante	Carica batterica in CFU/ml
< 10	-	-	10 ³
< 10	< 10	-	10 ⁴
> 10	> 10	< 10	10 ⁵
> 10	> 10	> 10	10 ⁶

La carica batterica è considerata significativa, ovvero si considerano i microrganismi isolati patogeni, se superiore a 10⁵.

Dopo un'incubazione delle piastre per 24/48 ore a 35/37° in aerobiosi o in 5/10% di CO₂, a seconda del terreno, sono stati riconosciuti i patogeni, sono stati eventualmente eseguiti test ulteriori di tipi biochimico o eseguite semine su terreni più selettivi per identificare con precisione il patogeno, è stato eseguito l'antibiogramma ed è stato dato il referto definitivo.

Analisi statistica

Le differenze ai vari time points rispetto al basale sono state valutate mediante t test per dati appaiati. Le differenze tra i gruppi ai vari time points sono state valutate mediante t test per dati non appaiati. La significatività statistica è stata considerata per $p < 0.05$.

Risultati

Popolazione dello studio

Abbiamo reclutato nello studio 31 pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva di grado moderato, randomizzati in due gruppi (in terapia con l'associazione tra un corticosteroide inalatorio ed un broncodilatatore a lunga durata d'azione e con un broncodilatatore a lunga durata d'azione da solo, rispettivamente), confrontabili per età, sesso, abitudine tabagica e funzione respiratoria.

Le caratteristiche della popolazione, oggetto dello studio, sono riportate in tabella 1.

	Pazienti in trattamento con ICS + LABA	Pazienti in trattamento con LABA
Numero di pazienti	16	15
Età	68 ± 1.6	70 ± 2.1
Sesso (M/F)	11/5	9/6
Abitudine tabagica (pack/year)	28 ± 6	23 ± 5
FEV1 post-broncodilatatore (l)	1.47 ± 0.1	1.67 ± 0.2
FEV1 post-broncodilatatore (%)	62.2 ± 1.7	65.1 ± 2.2

Tabella 1: caratteristiche della popolazione, oggetto dello studio (LABA = broncodilatatori a lunga durata d'azione; ICS = corticosteroidi inalatori).

Andamento della funzionalità respiratoria

Innanzitutto abbiamo voluto indagare l'andamento della funzionalità respiratoria (misurata in termini di FEV1 post-broncodilatatore, sia come percentuale rispetto al teorico, sia in valore assoluto misurato in litri).

Dopo sei mesi di trattamento non si è evidenziato un cambiamento significativo della funzionalità respiratoria nell'intera popolazione dello studio, come mostrato dal grafico 1.

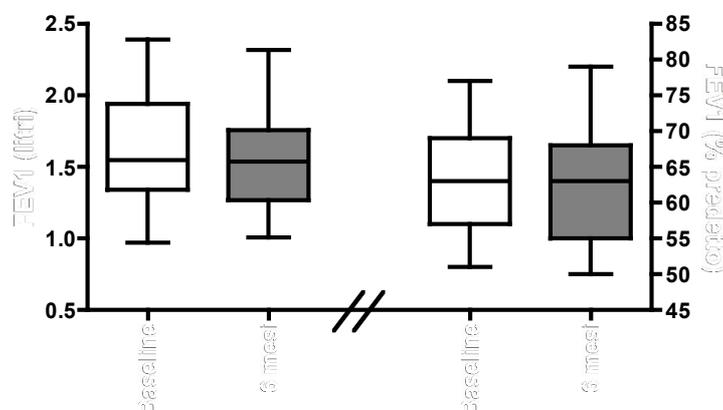


Grafico 1: andamento della funzionalità respiratoria nell'intera popolazione, oggetto dello studio.

L'analisi dei due gruppi non ha evidenziato un cambiamento significativo della funzionalità respiratoria, né nel gruppo trattato con un corticosteroide inalatorio + un broncodilatatore a lunga durata d'azione, né nel gruppo trattato con un broncodilatatore a lunga durata d'azione da solo, come mostrato dal grafico 2.

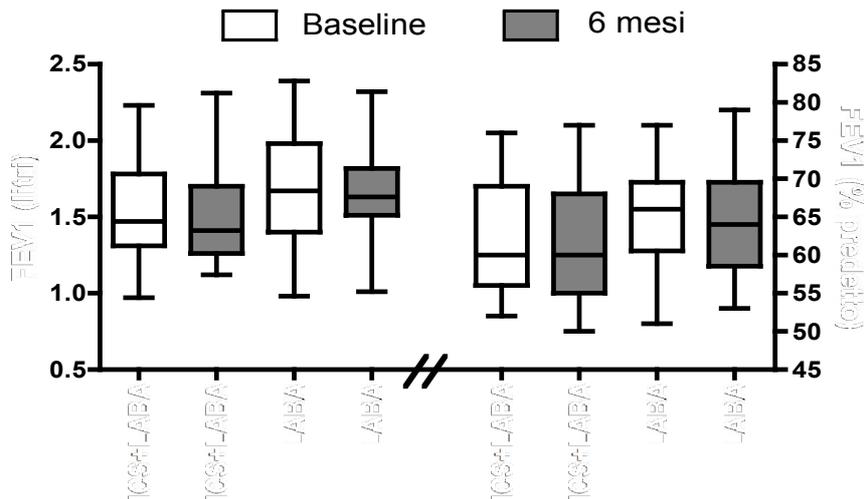


Grafico 2: andamento della funzionalità respiratoria nei due gruppi (LABA = broncodilatatori a lunga durata d'azione; ICS = corticosteroidi inalatori).

Andamento dell'inflammazione delle vie aeree

Abbiamo poi voluto indagare l'andamento dell'inflammazione delle vie aeree, sia valutando il numero totale di cellule infiammatorie, sia la conta differenziale delle cellule infiammatorie, presenti nell'espettorato. Dopo sei mesi di trattamento non si è evidenziato un cambiamento significativo dell'inflammazione delle vie aeree, né in termini di cellularità totale, né in termini di conta differenziale di cellule infiammatorie, nell'intera popolazione dello studio, come mostrato dal grafico 3.

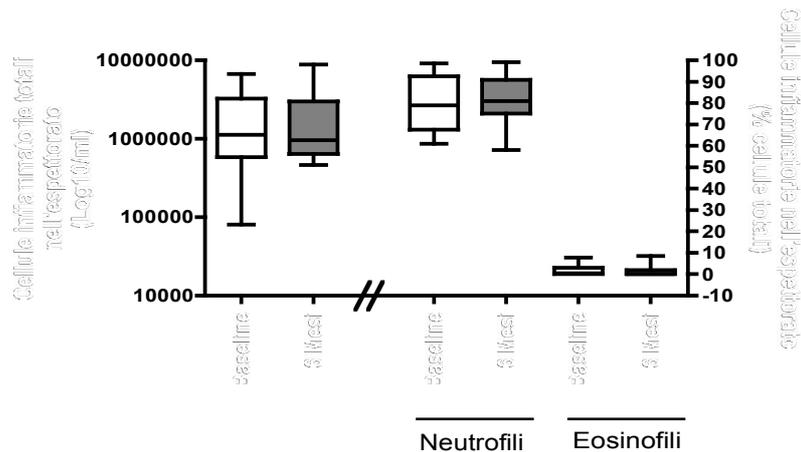


Grafico 3: andamento dell'inflammatione delle vie aeree nella popolazione totale, oggetto dello studio.

L'analisi dei due gruppi non ha evidenziato un cambiamento significativo dell'inflammatione delle vie aeree, né nel gruppo trattato con un corticosteroide inalatorio + un broncodilatatore a lunga durata d'azione, né nel gruppo trattato con un broncodilatatore a lunga durata d'azione da solo, come mostrato dal grafico 4.

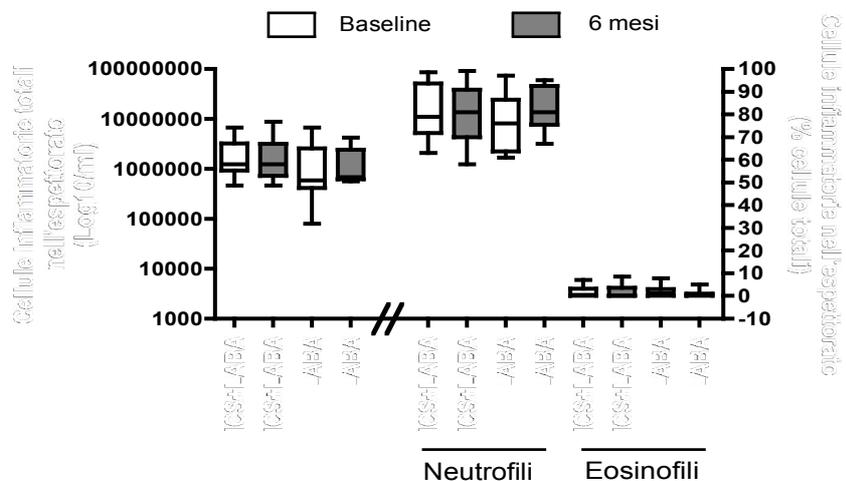


Grafico 4: andamento dell'inflammatione delle vie aeree nei due gruppi (LABA = broncodilatatori a lunga durata d'azione; ICS = corticosteroidi inalatori).

Andamento della carica batterica nelle vie aeree

Infine, abbiamo voluto valutare l'andamento della carica batterica nell'espettorato. Dopo sei mesi di trattamento non si è evidenziato un cambiamento significativo della carica batterica nell'intera popolazione dello studio, come mostrato dal grafico 5.

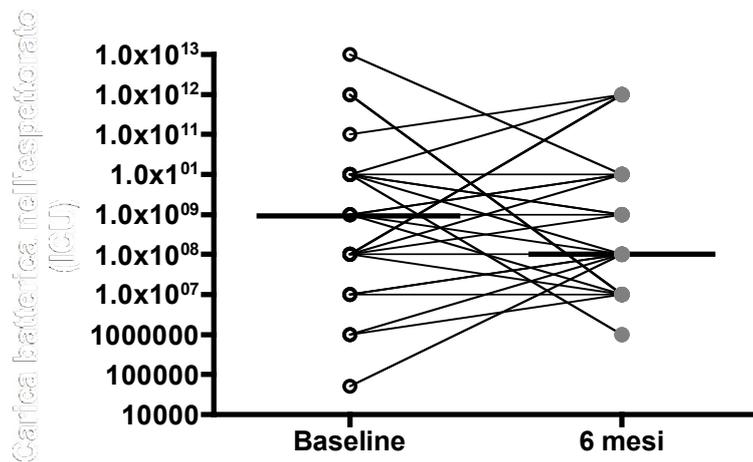


Grafico 5: andamento della carica batterica nell'espettorato, nell'intera popolazione, oggetto dello studio.

L'analisi dei due gruppi ha evidenziato livelli di carica batterica sovrapponibili al baseline. Il valore della carica batterica, dopo sei mesi di trattamento, nel gruppo trattato con un corticosteroide inalatorio + un broncodilatatore a lunga durata d'azione è risultato essere significativamente maggiore rispetto al gruppo trattato con un broncodilatatore a lunga durata d'azione da solo ($p < 0.001$), come mostrato dal grafico 6.

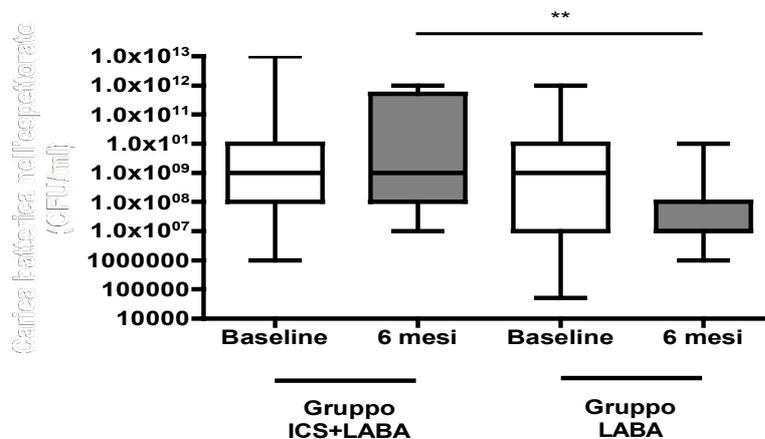


Grafico 6: andamento della carica batterica nell'espettorato, nei due gruppi (LABA = broncodilatatori a lunga durata d'azione; ICS = corticosteroidi inalatori).

Nel gruppo trattato con un corticosteroide inalatorio + un broncodilatatore a lunga durata d'azione il numero di pazienti in cui è possibile identificare un microrganismo potenzialmente patogeno, dopo sei mesi di trattamento, è 1.8 volte superiore rispetto al valore basale, come mostrato dal grafico 7. Nel gruppo trattato con un broncodilatatore a lunga durata d'azione da solo non si evidenzia nessuna differenza nella possibilità di identificare un microrganismo potenzialmente patogeno, dopo sei mesi di trattamento.

Tuttavia, si segnala che nel gruppo trattato con un broncodilatatore a lunga durata d'azione da solo il numero di soggetti in cui è possibile identificare un microrganismo potenzialmente patogeno al baseline è maggiore rispetto al gruppo trattato con un corticosteroide inalatorio + un broncodilatatore a lunga durata d'azione (66% verso 38%).

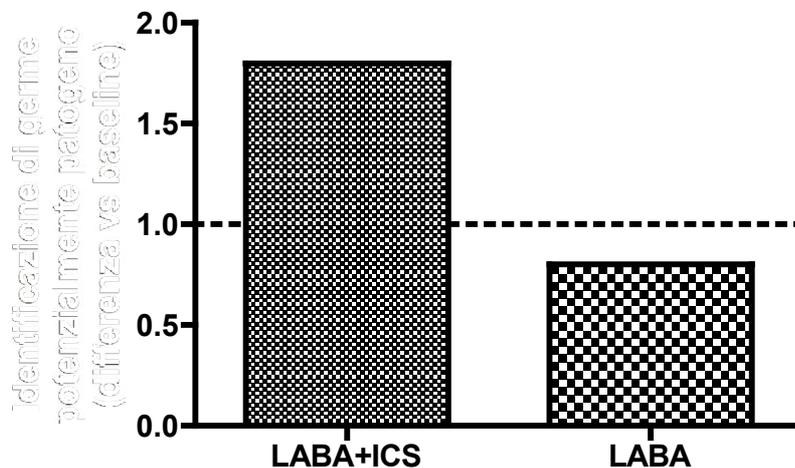


Grafico 7: possibilità d'identificare un microrganismo potenzialmente patogeno nei due gruppi, differenza verso il baseline (LABA = broncodilatatori a lunga durata d'azione; ICS = corticosteroidi inalatori).

Riacutizzazioni

Abbiamo valutato anche l'andamento della funzionalità respiratoria, dell'infiammazione e della carica batterica nelle vie aeree nelle riacutizzazioni della malattia, rispetto alla fase di stabilità.

Nel corso dei sei mesi di studio, si sono verificati 7 episodi di riacutizzazione, equamente ripartiti nei due gruppi (4 episodi si sono verificati nel gruppo trattato con un corticosteroide inalatorio + un broncodilatatore a lunga durata d'azione, 3 nel gruppo trattato con un broncodilatatore a lunga durata d'azione da solo; ($p > 0.05$)).

Nei pazienti in cui si è verificata una riacutizzazione abbiamo documentato una riduzione

significativa della funzionalità respiratoria ($p < 0.01$), un aumento significativo dell'inflammation totale delle vie aeree ($p < 0.05$) ed un aumento significativo della carica batterica, rispetto alla fase di stabilità ($p < 0.05$), come mostrato dai grafici 8, 9, 10.

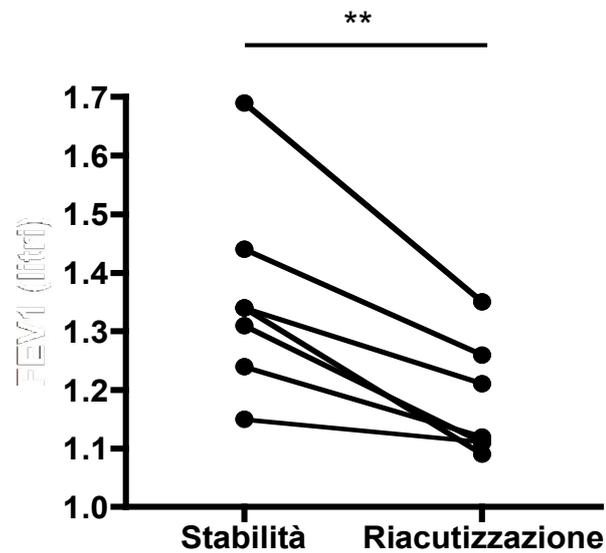


Grafico 8: andamento della funzionalità respiratoria nei pazienti in cui si è verificata una riacutizzazione della malattia, rispetto alla fase di stabilità.

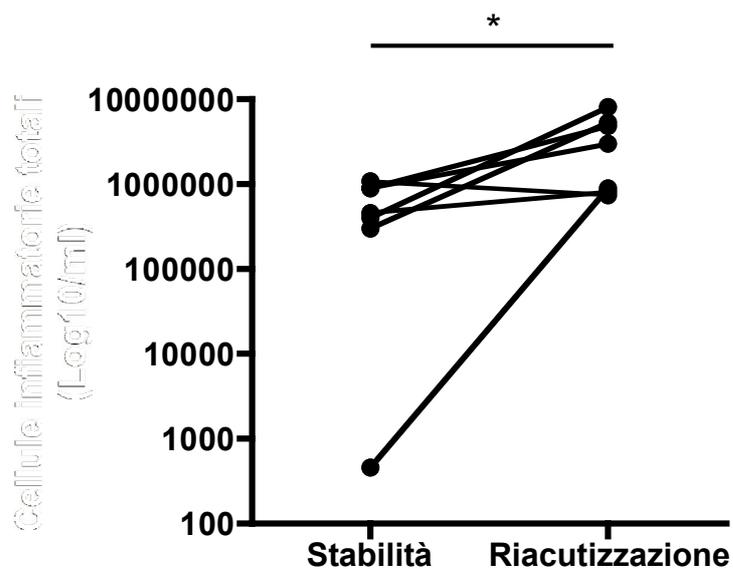


Grafico 9: andamento dell'inflammation delle vie aeree nei pazienti in cui si è verificata una riacutizzazione della malattia, rispetto alla fase di stabilità.

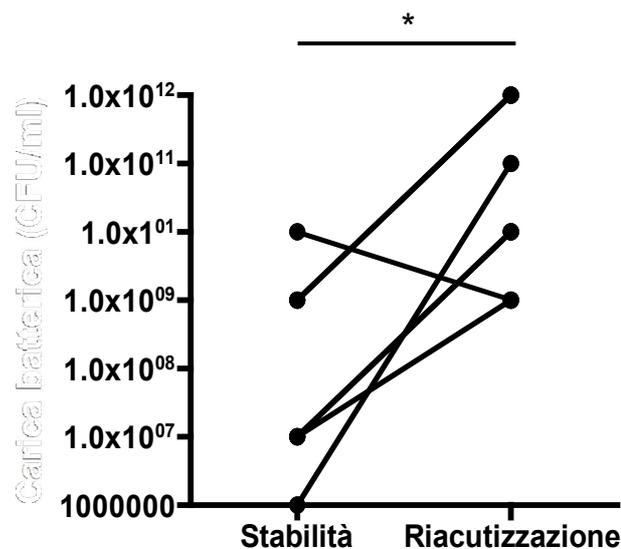


Grafico 10: andamento della carica batterica nell'espettorato dei pazienti in cui si è verificata una riacutizzazione della malattia, rispetto alla fase di stabilità.

Conclusioni

La Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree, prevenibile e trattabile, a decorso progressivo [35]. La storia naturale della BPCO è caratterizzata da episodi ricorrenti di peggioramento della sintomatologia denominati riacutizzazioni. Le riacutizzazioni contribuiscono al progressivo peggioramento della BPCO e rappresentano un fattore prognostico negativo in termini di sopravvivenza.

Grazie anche a metodiche recenti di biologia molecolare, è stato dimostrato che le infezioni, sia batteriche che virali, costituiscono non solo la causa principale delle riacutizzazioni, ma contribuiscono anche alla patogenesi della malattia [72].

I corticosteroidi inalatori sono utilizzati nel trattamento della BPCO e le ultime linee guida ne raccomandano l'uso nei pazienti con malattia grave e storia di frequenti riacutizzazioni. In tali pazienti i corticosteroidi inalatori sono in grado di ridurre gli eventi di riacutizzazione della malattia. Tuttavia, recenti studi prospettici, di grandi dimensioni, hanno riportato un aumento dei casi di polmonite nei pazienti con BPCO che assumono regolarmente i corticosteroidi per via inalatoria, suggerendo che questo trattamento possa facilitare le infezioni del tratto respiratorio [152, 153, 154]. Emerge quindi un apparente paradosso: da un lato gli steroidi per via inalatoria sono in grado di ridurre la frequenza di eventi per lo più infettivi come le riacutizzazione e dall'altro sembrano facilitare la comparsa di eventi infettivi come le polmoniti.

Nessuno studio, ha fino ad ora valutato in maniera longitudinale se il trattamento regolare con

corticosteroidi inalatori sia in grado di modificare la carica batterica nelle vie aeree.

Con questo obiettivo primario, abbiamo reclutato 31 pazienti con BPCO di grado moderato e li abbiamo randomizzati in due gruppi. Un gruppo è stato trattato con l'associazione per via inalatoria precostituita di un corticosteroide (fluticasone) e un broncodilatatore a lunga durata d'azione (salmeterolo); l'altro gruppo con il broncodilatatore a lunga durata d'azione da solo (salmeterolo). La durata del trattamento è stata di sei mesi.

Innanzitutto abbiamo analizzato l'andamento della funzionalità respiratoria, dell'infiammazione e della carica batterica delle vie aeree nella popolazione totale e nei due gruppi, durante i sei mesi di trattamento. Dopo sei mesi di trattamento non si è evidenziato un cambiamento significativo né della funzionalità respiratoria, né dell'infiammazione delle vie aeree, né della carica batterica nell'espettorato, nella popolazione complessiva, oggetto dello studio.

Analogamente, non abbiamo evidenziato un cambiamento significativo della funzionalità respiratoria e dell'infiammazione quando abbiamo analizzato l'andamento all'interno dei due gruppi. Viceversa, abbiamo riscontrato un aumento significativo della carica batterica delle vie aeree nel gruppo di pazienti trattati con un corticosteroide inalatorio + broncodilatatore a lunga durata d'azione, rispetto al gruppo trattato con solo broncodilatatore.

Tali dati suggeriscono, quindi, che i corticosteroidi per via inalatoria, pur non modificando la funzione respiratoria e l'infiammazione delle vie aeree dopo 6 mesi di trattamento, possano determinare un aumento della carica batterica delle vie aeree.

Abbiamo inoltre rilevato che, nel gruppo trattato con un corticosteroide inalatorio, si verifica un aumento del numero di soggetti in cui è possibile isolare un microrganismo potenzialmente patogeno. Questo potrebbe rappresentare un ulteriore dato, accanto a quello dell'aumento della carica microbica delle vie aeree, a favore dell'ipotesi che i corticosteroidi inalatori possano facilitare le infezioni del tratto respiratorio.

Le riacutizzazioni della BPCO sono eventi frequenti, caratterizzate da peggioramento dei sintomi. Tali episodi accelerano il declino della funzionalità respiratoria e, maggiore è la loro frequenza, peggiore è la prognosi, in termini di sopravvivenza a lungo termine.

Nel nostro studio, abbiamo valutato anche l'andamento della funzionalità respiratoria, dell'infiammazione e della carica batterica delle vie aeree nelle riacutizzazioni della malattia (che si sono verificate equamente nei due gruppi), rispetto alla fase di stabilità. Nei pazienti in cui si è verificata una riacutizzazione abbiamo evidenziato una riduzione significativa della funzionalità respiratoria ed un aumento significativo dell'infiammazione e della carica batterica delle vie aeree.

In conclusione, questo studio dimostra per la prima volta che il trattamento regolare con corticosteroidi inalatori favorisce la colonizzazione batterica delle vie aeree e si associa ad un aumentato isolamento di germi potenzialmente patogeni. Se tale aumento della carica batterica sia un fattore negativo in termini di controllo della sintomatologia e/o comparsa di eventi infettivi acuti dovrà essere valutato in studi specifici.

4.4 Ruolo dell'atopia e dell'asma sulla modulazione della risposta immunologica antivirale in bambini in età prescolare

Le infezioni virali durante i primi anni di vita sono un fattore noto di rischio per lo sviluppo di asma più avanti negli anni. Inoltre le infezioni virali rappresentano una delle cause più frequenti di riacutizzazione. Studi recenti hanno dimostrato che i pazienti asmatici adulti hanno una risposta immunitaria innata antivirale deficitaria nei confronti delle infezioni virali da rinovirus a livello delle vie aeree. Le cause di una tale risposta immunitaria antivirale aberrante non sono note. In particolare, dal momento che la risposta immunitaria antivirale deficitaria è stata descritta su una popolazione di pazienti adulti asmatici, non è noto se essa sia: 1) il risultato di una modulazione dell'infiammazione cronica che si instaura nel corso della vita dei pazienti asmatici; 2) una caratteristica intrinseca dei pazienti asmatici e che quindi sia presente fin dalla nascita; 3) l'effetto di una modulazione in senso inibitorio di un preesistente ambiente infiammatorio orientato in senso Th2 presente a livello delle vie aeree dei pazienti asmatici.

Scopo di questo lavoro è valutare se:

- 1) la deficitaria risposta immunologica antivirale sia una caratteristica della popolazione adulta asmatica o se invece rappresenti un elemento caratterizzante i soggetti asmatici, già in età pediatrica;
- 2) lo stato atopico condizioni la risposta immunologica innata antivirale;
- 3) le caratteristiche infiammatorie delle vie aeree dei soggetti asmatici e non asmatici con o senza atopia;
- 4) vi siano correlazioni tra il quadro anatomopatologico/infiammatorio presente a livello delle vie aeree e la risposta immunitaria antivirale. A tale scopo sono state reclutate quattro popolazioni pediatriche di soggetti asmatici non atopici, asmatici atopici, atopici non asmatici, controlli non asmatici e non atopici sottoposti ad indagine broncoscopica per fini clinico-diagnostici. Durante tale esame sono state raccolte mediante brushing le cellule epiteliali bronchiali, coltivate in vitro e successivamente infettate con rinovirus per valutare: 1) la replicazione virale del rinovirus in cellule epiteliali bronchiali di pazienti in età pediatrica asmatici e non asmatici; 2) la risposta immunologica innata antivirale in seguito all'infezione da rinovirus nelle cellule epiteliali bronchiali di pazienti in età pediatrica asmatici e non asmatici in termini di produzione di interferone-beta ed interferone-lambda. Sono state inoltre prelevate biopsie della mucosa bronchiale per valutare le caratteristiche infiammatorie (cellule infiammatorie, citochine Th2) presenti a livello della mucosa delle vie aeree.

L'identificazione di un'alterata risposta immunitaria antivirale già in età pediatrica, dimostrerebbe che tale aspetto rappresenta una caratteristica intrinseca dei soggetti asmatici e che quindi possa rappresentare un nuovo target farmacologico al fine di prevenire e modulare le riacutizzazioni asmatiche virus-indotte e quindi di conseguenza la storia naturale della malattia.

Materiali e metodi

Popolazione dello studio.

Presso il servizio di Broncoscopia Pediatrica dell'Università di Padova sono stati reclutati 34 bambini già candidati ad essere sottoposti ad esame broncoscopico per motivi clinici. I bambini arruolati sono stati suddivisi in asmatici e non asmatici secondo i seguenti criteri di inclusione [160]:

- bambini con ripetuti episodi di sibilo, tosse e difficoltà respiratoria (soprattutto se associati a sintomatologia notturna e mattutina) responsivi ai broncodilatatori;
- la presenza e la reversibilità degli episodi sintomatici riportati dai genitori/tutori confermata dal medico pediatra;
- la presenza di atopia definita dall'aumento delle IgE sia totali che specifiche;
- i bambini devono essere stati sottoposti al PRIST test, RAST test, agli esami ematici di routine, mentre la spirometria è stata utilizzata solamente nei bambini che sono stati in grado di cooperare durante il test.

Raccolta e coltura delle cellule epiteliali bronchiali primarie.

Le cellule epiteliali bronchiali umane (HBECs) sono state raccolte durante broncoscopia a fibre ottiche seguendo linee guida standardizzate internazionali [161] e coltivate come precedentemente descritto [104]. I genitori/tutori hanno firmato Consenso Informato prima di sottoporre il bambino al prelievo. Dopo l'esecuzione del brushing le cellule sono state raccolte all'interno di Falcon da 15 ml contenenti soluzione fisiologica sterile. Le falcon sono poi state centrifugate a 1500 rpm per 8 minuti, il soprannatante è stato eliminato ed il pallet cellulare è stato risospeso in 1 ml di siero bovino, trasferito in tubi per conservazione in azoto liquido ed 1 ml di soluzione di DMSO al 20% in siero bovino è stato aggiunto alle cellule prima del congelamento. Le cellule sono state poi scongelate, centrifugate a 1500 rpm per 8 minuti, il soprannatante eliminato e le cellule sono state risospese in 1 ml di terreno di coltura arricchito con ormoni specifici per cellule epiteliali bronchiali (BEGM; Clonetics, San Diego,

USA) contenente 50 U/ml di penicillina e 50µg/ml di streptomina. Le cellule sono state poi trasferite in fiasche Roux da 25 cm², per consentirne l'espansione. Le colture sono state mantenute in un incubatore a 37°C con 5% CO₂ in aria umidificata. Dopo due passaggi in fiasche Roux da 75 cm² le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (3 ml di una sospensione cellulare ad una concentrazione di 2 x10⁵/ml). Al raggiungimento dell'80% di confluenza le cellule sono state infettate con RV-16.

Infezione sperimentale in vitro con rinovirus16 (RV16).

La sera prima dell'infezione il terreno di coltura delle cellule epiteliali (arricchito con ormoni specifici per cellule epiteliali bronchiali) è stato sostituito con terreno privo di ormoni al fine di consentire la cessazione della replicazione cellulare e la sincronizzazione delle cellule. Il terreno è stato poi rimosso ed una quantità di virus pari a 5 MOI è stata aggiunta sulle cellule. Le cellule sono state messe su un agitatore per un'ora a temperatura ambiente. Dopo un'ora il terreno contenente il virus è stato rimosso in modo da allontanare il virus morto o che non si è legato alle cellule e terreno fresco è stato aggiunto alle cellule. A 8 ore e a 24 ore dopo l'infezione è stato raccolto il soprannatante per futuri saggi ELISA ed è stata effettuata l'omogeneizzazione delle cellule mediate specifici buffers (RLT Qiagen addizionato di beta-mercaptoetanololo) per consentire l'estrazione dell'mRNA totale.

Reazione a catena polimerasica quantitativa (TaqMan® PCR).

L'RNA virale e l'mRNA cellulare sono stati estratti dalla cellule utilizzando il "Mini Kit Rneasy" seguendo il protocollo suggerito dalla Casa Produttrice (Qiagen). 2µg di RNA è stato utilizzato per la sintesi del cDNA mediante l'impiego del kit per la polimerasi inversa "Omniscript RT kit" (Qiagen). La TaqMan® PCR è stata eseguita utilizzando specifici primers e sonde per IFN-λ1, RV16 e per 18S rRNA e la stessa coppia di primers e sonde per IFN-λ2 e per IFN-λ3 (IFN-λ2-3) (Tabella 2). La "reaction solution" per la TaqMan® PCR è stata allestita utilizzando 12.5µL 2x QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen), 300nM di ogni "primer senso", 900nM di ogni "primer antisenso" e 175nM di sonda per gli IFN-λ; 300nM sia di "primer senso" che di "primer antisenso" e 175nM di sonda per 18S rRNA; 50nM di "primer senso", 300nM di "primer antisenso" e 175nM di sonda per gli RV-16. 23 µL di "reaction solution" sono poi stati trasferiti in Heppendorf® da 0.2 ml ai quali sono stati aggiunti 2 µL di cDNA. La reazione è stata analizzata mediante l'impiego

dell'apparecchiatura Rotor Gene 6000 (Corbet) seguendo un protocollo standard come suggerito dalla Casa Produttrice. I risultati sono stati normalizzati rispetto all'amplificazione del rRNA 18S ed espressi in numero di copie di mRNA/ μ l di reazione grazie all'allestimento di una curva standard.

Target	Oligonucleotide Sequenze
IFN-λ1	Senso: 5'- GGA CGC CTT GGA AGA GTC ACT -3' Antisenso: 5'- AGA AGC CTC AGG TCC CAA TTC -3' Probe: 5'-FAM AGT TGC AGC TCT CCT GTC TTC CCC G TAMRA-3'
IFN-λ2-3	Senso: 5'- CTG CCA CAT AGC CCA GTT CA -3' Antisenso: 5'- AGA AGC GAC TCT TCT AAG GCA TCT T -3' Probe: 5'-FAM TCT CCA CAG GAG CTG CAG GCC TTT A TAMRA-3'
RV-16	Senso:5'-GTG AAG AGC CSC RTG TGC T-3' Antisenso: 5' GCT SCA GGG TTA AGG TTA GCC-3' Probe: 5'-FAM-TGA GTC CTC CGG CCC CTG AAT G-TAMRA-3'
18S rRNA	Senso: 5'- CGC CGC TAG AGG TGA AAT TCT -3' Antisenso: 5'- CAT TCT TGG CAA ATG CTT TCG-3' Probe: 5'-FAM ACC GGC GCA AGA CGG ACC AGA TAMRA-3'

Tabella 2. Sequenze dei primers e delle sonde per la RT-PCR quantitativa.

Biopsie bronchiali ed indagine immunoistochimica

Dopo averle processate e incluse in paraffina, le biopsie bronchiali sono state tagliate per ottenere un certo numero di sezioni.

Le biopsie bronchiali sono state considerate adatte all'analisi quando la membrana basale era spessa almeno 1 mm e l'area subepiteliale estesa almeno 0,1 mm².

Le sezioni sono state colorate con metodi di immunoistochimica per valutare il numero di cellule infiammatorie (eosinofili, neutrofili, mastociti e linfociti CD4+) ed il numero di cellule IL-4+. Le cellule infiammatorie (eosinofili, neutrofili, mastociti, macrofagi e linfociti T CD4+) sono state quantificate nell'area che si estende 50 μ m al di sotto della membrana basale e sono state espresse come numero di cellule positive per mm² di subepitelio.

Anticorpi murini monoclonali contro marcatori specifici sono stati usati per identificare eosinofili, neutrofilii, mastociti, macrofagi e cellule CD4+. Per il ritrovamento degli antigeni, le sezioni da colorare per macrofagi e mastociti sono state pretrattate con una soluzione acquosa di 0,1% di tripsina in 0,1% di cloruro di calcio a 37° C per 15 minuti. Il legame degli anticorpi monoclonali è stato rilevato con il metodo della fosfatasi alcalina, con il Fast Red come substrato.

Le cellule IL-4+ sono state evidenziate usando un anticorpo specifico anti-IL-4 umana. In particolare, per esporre gli epitopi immunoreattivi, le sezioni sono state riscaldate in un forno a microonde ad alta potenza per 40 minuti, in tampone citrato 10mM (pH 6.0). I vetrini sono stati trattati con siero di coniglio e poi incubati per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo policlonale primario di capra anti-IL-4 alla diluizione 1:100. In questa fase alcune sezioni sono state trattate come controlli negativi, mediante incubazione con IgG aspecifiche di capra.

Le sezioni sono state poi incubate con un anticorpo secondario biotinitato anti-IgG di capra per 30 minuti e in seguito con un reagente costituito da fosfatasi alcalina coniugata a streptavidina per 30 minuti. L'immunoreattività è stata visualizzata con Fast Red. Le sezioni sono state infine controcolorate con ematossilina di Mayer. Le cellule IL-4+ sono state quantificate nel subepitelio ed espresse come numero di cellule positive per mm² di tessuto esaminato.

Statistica

Le differenze tra i gruppi sono state analizzate usando il test non parametrico Kruskal-Wallis. Il test Mann-Whitney U è stato eseguito dopo il test Kruskal-Wallis quando era appropriato. Per i dati clinici, è stata eseguita un'analisi della varianza. I coefficienti di correlazione sono stati calcolati usando il metodo non parametrico rank di Spearman. I valori di probabilità di $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

Risultati

Popolazione dello studio

Nello studio sono stati reclutati 34 bambini (età media 4.6 anni \pm 1.2; 62% maschi) candidati ad essere sottoposti ad indagine broncoscopica per motivi clinici. Tenendo conto della storia clinica dei pazienti, della risposta a terapia aerosolica con broncodilatatori ed in base alle indagini allergologiche (Prick e RAST test) i pazienti sono stati ulteriormente suddivisi in quattro gruppi: 1) pazienti non asmatici non atopici (9 pazienti età media 4.6 \pm 0.9 anni) (gruppo N); 2) pazienti asmatici allergici (8 pazienti età media 4.4 \pm 0.7 anni) (gruppo AA); 3) pazienti asmatici non allergici (9 pazienti età media 5.1 \pm 1.1 anni) (gruppo ANA); pazienti atopici non asmatici (8 pazienti età media 4.5 \pm 1.2 anni) (gruppo A). In 21 pazienti è stato possibile eseguire una spirometria. In tali pazienti il rapporto FEV1/VC medio è risultato 91 \pm 3% rispetto al predetto ed il FEV1 medio è risultato 86.7 \pm 4% rispetto al predetto, ovvero nessuno dei soggetti studiati presentava una spirometria patologica.

	Asmatici Atopici (AA)	Asmatici Non Atopici (ANA)	Atopici non asmatici (A)	Controlli
Numero Pazienti	8	9	8	9
Età (anni)	4.4 \pm 0.7	5.1 \pm 1.1	4.5 \pm 1.2	4.6 \pm 0.9
Sesso M/F (% maschi)	5/3 (63%)	5/4 (56%)	5/3 (63%)	6/3 67%
Età inizio sintomi (anni)	2.2 \pm 0.7	3.3 \pm 0.9	---	---

Tabella: Caratteristiche della popolazione

Induzione di interferone- λ (IFN- λ) in seguito ad infezione sperimentale con rinovirus 16 (RV16) nelle cellule epiteliali bronchiali.

L'infezione sperimentale con rinovirus delle cellule epiteliali bronchiali raccolte mediante brushing durante l'indagine broncoscopica e successivamente coltivate in vitro, è stata in grado di indurre un aumento significativo dell'espressione di mRNA per IFN- λ a 8 ore dopo l'infezione con RV16 (RV) rispetto alle cellule stimulate con solo terreno di coltura (Medium) ($p < 0.001$) (Figura 4). Come controllo negativo in alcune condizioni sperimentali il virus è stato rimosso mediante filtrazione e le cellule sono state stimulate con solo il terreno di coltura che precedentemente conteneva il virus (f-RV). In tali condizioni sperimentali non si è dimostrata una produzione significativa di mRNA per IFN- λ dimostrando che il RV16 vivo è necessario per l'induzione dell' IFN- λ . I risultati sin qui riportati si riferiscono alla popolazione dello studio nella sua interezza ovvero comprendente tutti i 34 soggetti reclutati (Figura 4).

Induzione di interferone- β (IFN- β) in seguito ad infezione sperimentale con rinovirus 16 (RV16) nelle cellule epiteliali bronchiali.

L'infezione sperimentale con rinovirus delle cellule epiteliali bronchiali raccolte mediante brushing durante l'indagine broncoscopica e successivamente coltivate in vitro, è stata in grado di indurre un aumento significativo dell'espressione di mRNA per IFN- β a 8 ore dopo l'infezione con RV16 (RV) rispetto alle cellule stimulate con solo terreno di coltura (Medium) ($p < 0.001$) (Figura 4). Come controllo negativo in alcune condizioni sperimentali il virus è stato rimosso mediante filtrazione e le cellule sono state stimulate con solo il terreno di coltura che precedentemente conteneva il virus (f-RV). In tali condizioni sperimentali non si è dimostrata una produzione significativa di mRNA per IFN- β dimostrando che il RV16 vivo è necessario per l'induzione dell' IFN- λ . I risultati sin qui riportati si riferiscono alla popolazione dello studio nella sua interezza ovvero comprendente tutti i 34 soggetti reclutati.

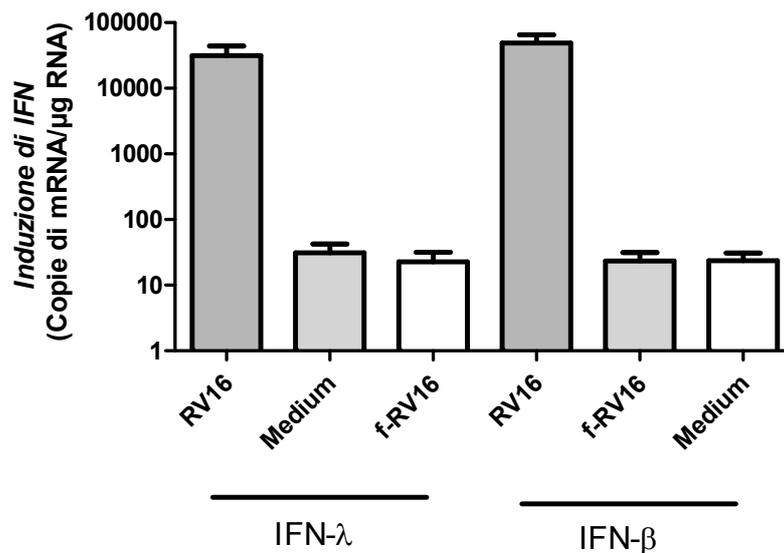


Figura 4. Induzione da parte del rinovirus 16 dell'mRNA per interferone lambda e beta in cellule epiteliali bronchiali

Induzione di interferone- λ (IFN- λ) e interferone- β (IFN- β) in seguito ad infezione sperimentale con rinovirus 16 (RV16) nelle cellule epiteliali bronchiali nei sottogruppi della popolazione dello studio

Dopo aver dimostrato che l'infezione sperimentale con RV16 nelle cellule epiteliali bronchiali coltivate in vitro è in grado di indurre la produzione sia di mRNA per IFN- λ che IFN- β

(Figura 4) abbiamo voluto valutare se esiste un diverso pattern di induzione di mRNA per IFN- λ e IFN- β nei vari sottogruppi.

I risultati hanno dimostrato che l'induzione di mRNA per IFN- λ è significativamente minore in seguito ad infezione con RV16 nelle cellule epiteliali bronchiali prelevate da pazienti asmatici allergici (AA), pazienti asmatici non allergici (ANA) e pazienti atopici non asmatici (A) rispetto a pazienti normali (non asmatici non allergici – N) ($p < 0.05$ per tutti e tre i gruppi vs i pazienti normali). (Figura 5). Nessuna differenza di induzione di mRNA per IFN- λ è stata evidenziata tra i pazienti asmatici allergici (AA), pazienti asmatici non allergici (ANA) e pazienti atopici non asmatici (A).

In maniera analoga, l'induzione di mRNA per IFN- β è significativamente minore in seguito ad infezione con RV16 nelle cellule epiteliali bronchiali prelevate da pazienti asmatici allergici (AA), pazienti asmatici non allergici (ANA) e pazienti atopici non asmatici (A) rispetto a pazienti normali (non asmatici non allergici – N) ($p < 0.05$ per tutti e tre i gruppi vs i pazienti normali) (Figura 6). Nessuna differenza di induzione di mRNA per IFN- β è stata evidenziata tra i pazienti asmatici allergici (AA), pazienti asmatici non allergici (ANA) e pazienti atopici non asmatici (A).

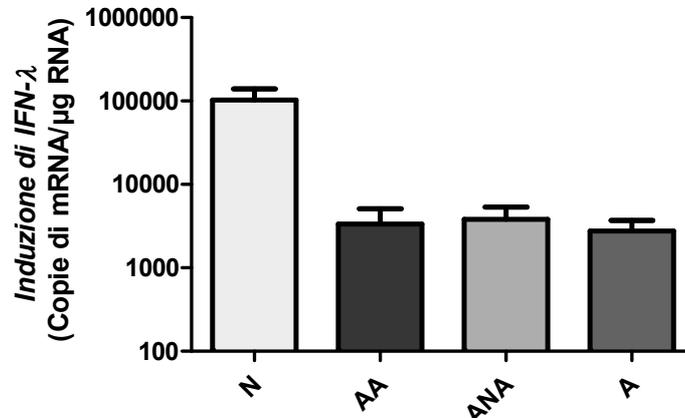


Figura 5. Induzione da parte del rinovirus 16 dell'mRNA per interferone lambda in cellule epiteliali bronchiali nei vari gruppi dello studio (N: pazienti normali, AA: pazienti asmatici allergici, ANA: pazienti asmatici non allergici, A: pazienti atopici non asmatici).

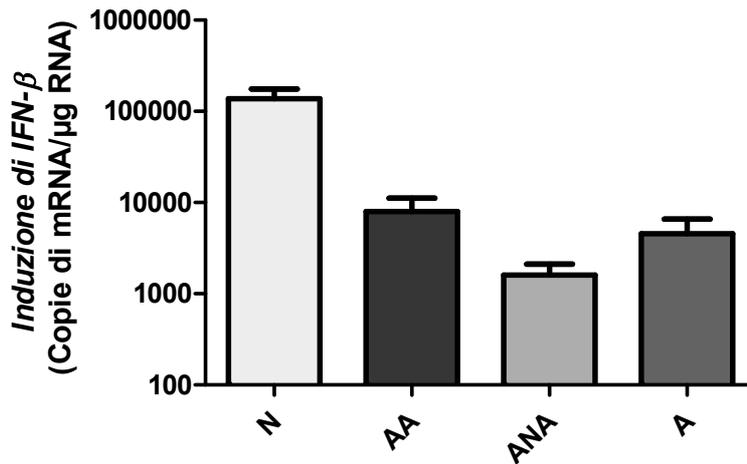


Figura 6. Induzione da parte del rinovirus 16 dell'mRNA per interferone beta in cellule epiteliali bronchiali nei vari gruppi dello studio (N: pazienti normali, AA: pazienti asmatici allergici, ANA: pazienti asmatici non allergici, A: pazienti atopici non asmatici).

Replicazione del rinovirus16 (RV16) nelle cellule epiteliali bronchiali.

L'epitelio bronchiale rappresenta la sede naturale dell'infezione da rinovirus nelle vie aeree. Abbiamo voluto valutare se esiste una diversa capacità di replicazione del rinovirus16 (RV16) in seguito ad infezione in cellule epiteliali bronchiali prelevate da pazienti normali non asmatici e non allergici, asmatici atopici, asmatici non atopici e non asmatici atopici. I dati documentano che la replicazione del RV16 è significativamente maggiore in cellule epiteliali bronchiali prelevate da paziente asmatico atopico (AA – $p < 0.05$ vs N) ed asmatico non atopico (ANA – $p < 0.05$ vs N) rispetto alla replicazione che si verifica in cellule epiteliali bronchiali prelevate da pazienti non asmatici non allergici (N) (Figura 7). Anche in cellule epiteliali bronchiali prelevate da paziente atopico non asmatico (A) si verifica un aumento della replicazione del RV16 rispetto a pazienti non asmatici non allergici (N) tuttavia tale aumento non raggiunge la significatività statistica ($p = 0.09$; A vs N).

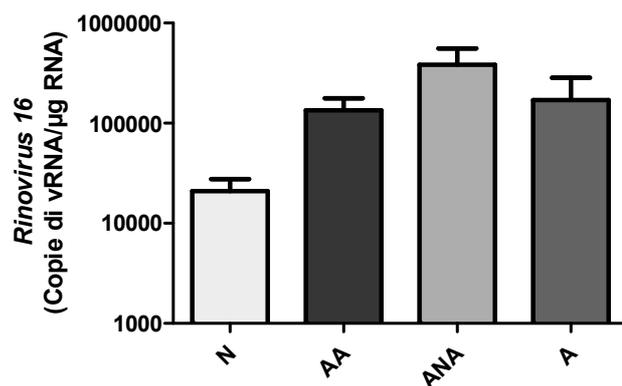


Figura 7. Replicazione del rinovirus (RV16) nelle cellule epiteliali bronchiali nei vari gruppi dello studio (N: pazienti normali, AA: pazienti asmatici allergici, ANA: pazienti asmatici non allergici, A: pazienti atopici non asmatici).

Correlazioni tra replicazione virale e induzione di interferone nelle cellule epiteliali bronchiali

Al fine di valutare il ruolo protettivo della produzione di interferoni, a livello delle cellule epiteliali bronchiali, nei confronti dell'infezione da rinovirus 16 (RV16) abbiamo cercato possibili correlazioni tra l'induzione di interferone e la replicazione del RV16. Abbiamo trovato una significativa correlazione negativa tra la replicazione virale e sia l'induzione di IFN- λ ($p < 0.01$; $r = -0.59$) (Figura 8) che l'induzione di IFN- β ($p < 0.001$; $r = -0.65$) (Figura 9).

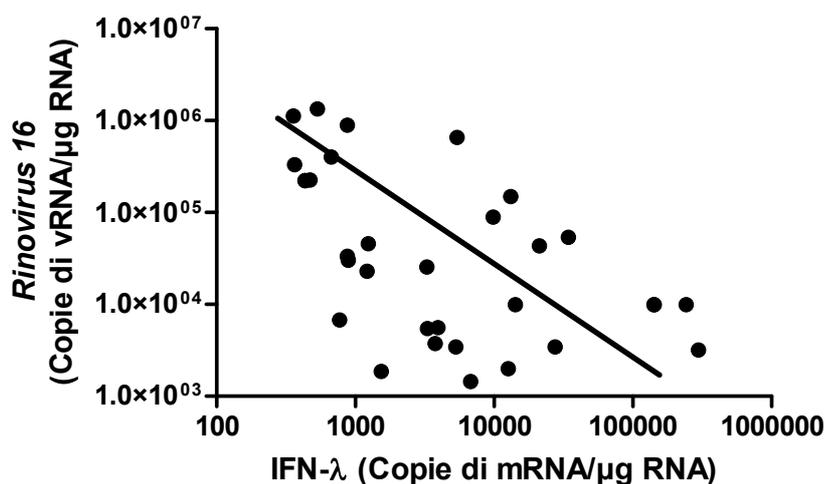


Figura 8. Correlazione tra replicazione virale e induzione di interferone λ nelle cellule epiteliali bronchiali dopo infezione sperimentale con rinovirus16.

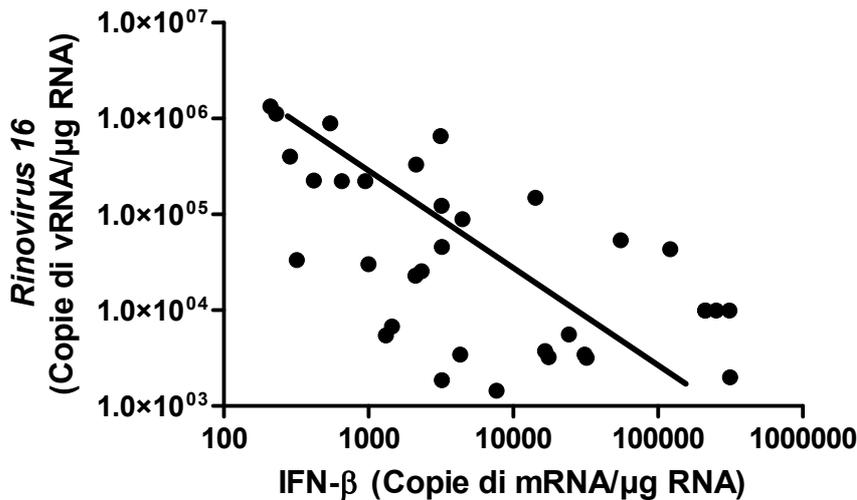


Figura 9. Correlazione tra replicazione virale e induzione di interferone β nelle cellule epiteliali bronchiali dopo infezione sperimentale con rinovirus16.

Caratteristiche infiammatorie delle vie aeree inferiori nei soggetti asmatici atopici, asmatici non atopici, atopici non asmatici e controllo non asmatici e non atopici.

Abbiamo valutato 21 biopsie prelevate da pazienti non atopici non asmatici (N, n=6), asmatici atopici (AA, n=5), asmatici non atopici (ANA, n=5) e atopici non asmatici (A, n=5). I risultati dimostrano un aumento significativo degli eosinofili nelle vie aeree inferiori dei pazienti asmatici sia atopici (AA – 134.4 ± 45.1) che non atopici (ANA – 151.6 ± 37.57) rispetto ai soggetti non asmatici e non atopici (N – 7.66 ± 2.59) ($p < 0.01$). Anche nei soggetti atopici non asmatici (A – 67.8 ± 27.1) abbiamo documentato un aumento degli eosinofili rispetto ai soggetti di controllo non asmatici e non atopici (N) ($p < 0.05$). Inoltre non vi è differenza tra i valori di eosinofili presenti nelle vie aeree dei soggetti asmatici atopici (AA) rispetto ai soggetti asmatici non atopici (ANA) (134.4 ± 45.16 vs 151.6 ± 37.5 , $p = 0.56$) (Figura 10).

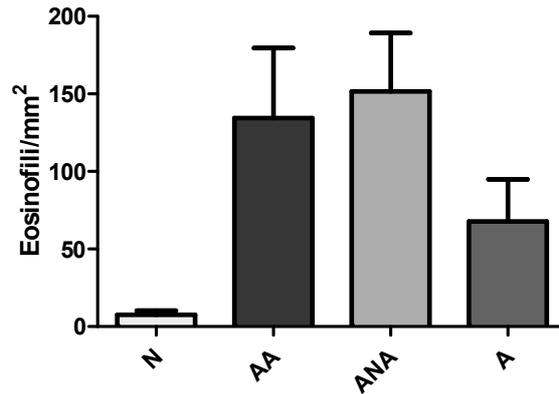


Figura 10. Presenza di eosinofili nelle biopsie bronchiali di pazienti non asmatici non atopici(N), asmatici atopici (AA), asmatici non atopici(ANA) e atopici non asmatici(A).

Per quanto concerne le altre cellule infiammatorie (neutrofili, macrofagi, mast cellule e linfociti CD4+) non sono state descritte differenze significative tra i gruppi.

Inoltre abbiamo documentato un aumento significativo delle cellule infiammatorie IL-4+ nelle vie aeree inferiori dei pazienti asmatici sia atopici (AA – 223.4±58.3) che non atopici (ANA – 293.0±95.0) rispetto ai soggetti non asmatici e non atopici (N – 72.0±18.0) ($p < 0.01$). Anche nei soggetti atopici non asmatici (A – 174.7±30.9) abbiamo documentato un aumento delle cellule infiammatorie IL-4+ rispetto ai soggetti di controllo non asmatici e non atopici (N), tuttavia tale differenza non è statisticamente significativa ($p = 0.19$). Infine, non vi è differenza tra il numero delle cellule infiammatorie IL-4+ presenti nelle vie aeree dei soggetti asmatici atopici (AA) rispetto ai soggetti asmatici non atopici (ANA) (223.4±58.3 vs 293.0±95.0, $p = 0.56$). (Figura 11).

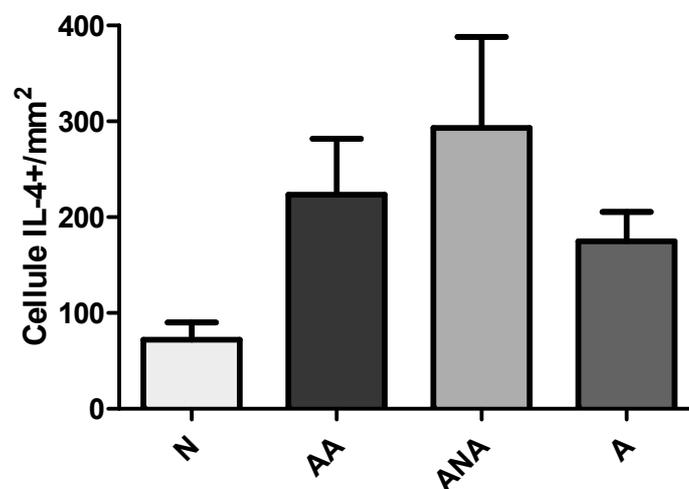


Figura 11. Presenza di cellule infiammatorie IL-4+ nelle biopsie bronchiali di pazienti non asmatici non atopici(N), asmatici atopici(AA), asmatici non atopici(ANA) e atopici non asmatici(A).

Correlazioni tra infiammazione delle vie aeree inferiori e produzione di interferoni dopo infezione con rinovirus

Al fine di valutare se il preesistente ambiente infiammatorio presente a livello delle vie aeree inferiori possa condizionare la risposta immunologica innata antivirale, abbiamo valutato la presenza di possibili correlazioni tra infiammazione delle vie aeree inferiori e produzione di interferoni dopo infezione con rinovirus. Abbiamo documentato una correlazione inversa ancorché non significativa tra presenza di cellule infiammatorie IL-4+ e produzione sia di IFN- λ ($r=-0.44$; $p=0.11$) (Figura 12) che IFN- β ($r=-0.39$; $p=0.12$) (Figura 13).

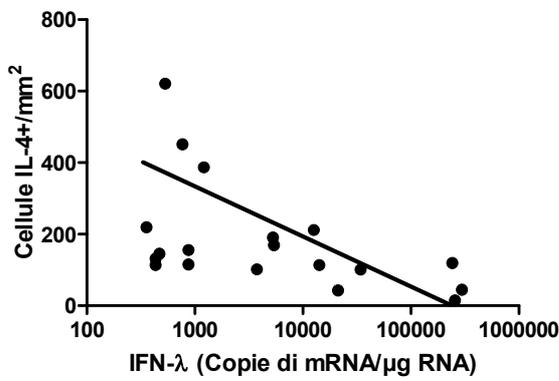


Figura 12. Correlazione tra produzione di IFN- λ nelle cellule epiteliali bronchiali dopo infezione ex vivo con rinovirus e presenza di cellule IL-4+ nelle biopsie bronchiali.

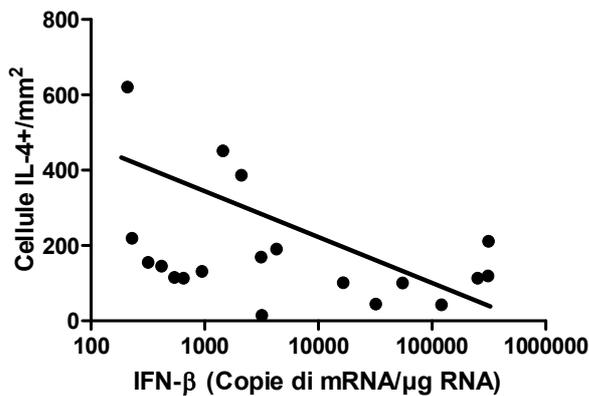


Figura 13. Correlazione tra produzione di IFN- β nelle cellule epiteliali bronchiali dopo infezione ex vivo con rinovirus e presenza di cellule IL-4+ nelle biopsie bronchiali.

Discussione

Il presente lavoro ha valutato per la prima volta le caratteristiche della risposta immunologica innata antivirale a livello delle vie aeree di soggetti asmatici in età prescolare. Inoltre ha consentito di valutare il ruolo dell'atopia e dell'ambiente infiammatorio che caratterizza le vie aeree inferiori dei soggetti atopici/asmatici nel modulare tale risposta immunologica antivirale. Il razionale di questo studio nasce dall'evidenza che le infezioni virali delle vie aeree rappresentano la principale causa di riacutizzazione asmatica (il rinovirus – ovvero il virus del comune raffreddore – rappresenta il virus più frequentemente identificato) [93] e che i pazienti asmatici adulti manifestano una deficitaria risposta immunologica innata nei confronti delle infezioni virali respiratorie [102, 103]. Tale risposta alterata sarebbe alla base dell'aumentata suscettibilità clinica dei pazienti asmatici nei confronti delle infezioni virali respiratorie [94, 102]. Tuttavia dal momento che la risposta immunitaria antivirale deficitaria è stata descritta su una popolazione di pazienti atopici adulti asmatici, non è noto se essa sia: 1) il risultato di una modulazione dell'infiammazione cronica che si instaura nel corso della vita dei pazienti asmatici; 2) una caratteristica intrinseca dei pazienti asmatici e che quindi sia presente fin dalla nascita.

I dati derivanti dal nostro studio documentano che nei soggetti asmatici (indipendentemente dallo stato atopico) si verifica una diminuita produzione di interferoni ed un'aumentata replicazione virale dopo infezione sperimentale ex vivo con rinovirus a livello delle cellule epiteliali bronchiali. Inoltre la medesima alterata risposta immunitaria antivirale innata si verifica nei soggetti atopici non asmatici. In altre parole abbiamo documentato un simile comportamento in termini di aberrante risposta immunologica innata antivirale (associata ad una aumentata replicazione virale) nei soggetti asmatici o atopici. E' interessante notare come esista un denominatore infiammatorio comune tra questi tre gruppi di pazienti (asmatici atopici, asmatici non atopici, atopici non asmatici). I risultati infatti documentano un aumento di eosinofili ed un aumento delle cellule infiammatorie che esprimono IL-4 a livello delle vie aeree inferiori in tutti e tre i gruppi di pazienti studiati rispetto al gruppo di soggetti non asmatici non atopici. Ovvero le vie aeree dei soggetti asmatici (indipendentemente dallo stato atopico) e dei soggetti atopici (indipendentemente dalla presenza di asma) sono caratterizzate da un prevalente ambiente infiammatorio orientato in senso Th2.

Pertanto, potrebbe essere il preesistente ambiente infiammatorio orientato in senso Th2 (indipendentemente dalla presenza fenotipica/clinica di asma bronchiale) a condizionare la risposta immunologica innata. Tale osservazione è supportata anche dalla correlazione inversa (che tuttavia non raggiunge la significatività statistica anche in ragione del limitato numero di

soggetti studiati sino ad ora) tra presenza di cellule infiammatorie orientate in senso Th2 (ovvero produttori IL-4) e la produzione di interferoni dopo infezione sperimentale con rinovirus.

In conclusione abbiamo documentato che l'aberrante risposta immunologica innata antivirale, precedentemente descritta nella popolazione asmatica adulta [102, 103], è presente sin dai primi anni di vita a livello delle vie aeree dei soggetti asmatici. Tuttavia sembrerebbe che tale caratteristica derivi dal condizionamento in senso inibitorio dell'ambiente infiammatorio Th2 sulla risposta immunologica antivirale e sulla clearance virale. Studi futuri saranno necessari per comprendere i meccanismi molecolari attraverso i quali l'ambiente infiammatorio Th2 possa modulare la risposta immunologica innata antivirale. La comprensione di tali meccanismi fornirà nuovi target di intervento farmacologico in grado di migliorare il trattamento e la prevenzione delle riacutizzazioni asmatiche virus indotte ed in ultima analisi la storia naturale dell'asma bronchiale.

BIBLIOGRAFIA

1. Global Initiative for Asthma (GINA), *Global strategy for Asthma Management and Prevention*. Last Update December 2011. Available at: www.ginasthma.org
2. Woolcock, A.J., J.K. Peat, and L.M. Trevillor, *Is the increase in asthma prevalence linked to increase in allergy load?* *Allergy*, 1995. 50: p. 935-40.
3. American Thoracic Society. *Guidelines for methacoline and exercise challenge testing 1999*. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 161. pp 309-329, 2000
4. Joos GF, Germonpre' PR, Pawels RA. *Neural mechanism in asthma*. *Clin exp Allergy* 2000 Jun; 30 Suppl 1: 60-5.
5. M.R. Miller, R. Crapo, J. Hankinson, V. Brusasco, F. Burgos, R. Casaburi, A. Coates, P. Enright, C.P.M. van der Grinten, P. Gustafsson, R. Jensen, D.C. Johnson, N. MacIntyre, R. McKay, D. Navajas, O.F. Pedersen, R. Pellegrino, G. Viegi and J. Wanger. *General considerations for lung function testing*. *Eur Respir J* 2005; 26: 153–161
6. Makino, S., et al., *Epidemiology of asthma*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005. 136 Suppl 1: p. 5-13.
7. *The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC*. *Lancet*, 1998. 351: p. 1225-32.
8. Faniran, A.O., J.K. Peat, and A.J. Woolcock, *Prevalence of atopy, asthma symptoms and diagnosis, and the management of asthma: comparison of an affluent and a non-affluent country*. *Thorax*, 1999. 54: p. 606-10.
9. *Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*. *Eur Respir J*. 12: p. 315-35.
10. Woolcock, A.J., J.K. Peat, and L.M. Trevillor, *Is the increase in asthma prevalence linked to increase in allergy load?* *Allergy*, 1995. 50: p. 935-40.
11. Wuthrich, B., *Epidemiology of the allergic disease: are they really on the increase?* *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1989. 90: p. 3-10.

12. Matricardi, P.M., et al., *Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis a virus*. BMJ, 1997. 314(7086): p. 999-.
13. Shaheen, S.O., et al., *Measles and atopy in Guinea-Bissau*. Lancet, 1996. 347(9018): p. 1792-6.
14. Shirakawa, T., et al., *The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder*. Science, 1997. 275(5296): p. 77-9.
15. Platts-Mills, T.A., et al., *Is the hygiene hypothesis still a viable explanation for the increased prevalence of asthma?* Allergy, 2005. 60 Suppl 79: p. 25-31.
16. Loza, M.J., S.P. Peters, and R.B. Penn, *Atopy, asthma, and experimental approaches based on the linear model of T cell maturation*. Clinical & Experimental Allergy, 2005. 35(1): p. 8-17.
17. Ramsey, C.D. and J.C. Celedon, *The hygiene hypothesis and asthma*. Curr Opin Pulm Med, 2005. 11(1): p. 14-20.
18. Rees, J., *ABC of asthma. Prevalence*. Bmj, 2005. 331(7514): p. 443-5.
19. Verlato, G., et al., *Is the prevalence of adult asthma and allergic rhinitis still increasing? Results of an Italian study*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(6): p. 1232-8.
20. Global Initiative for Asthma (GINA), *Global strategy for Asthma Management and Prevention*. NHLBI/WHO Workshop report. 2002. NIH Publication 02-3659.: p. Last Update 2008
21. Crimi, et al., *Epidemiologia dell'asma bronchiale*. In: *Rapporto sull'asma*. De Palma, Grassi eds. Sintagma. Milano. 1997: p. 7-40.
22. Illi, S., et al., *Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study*. Lancet, 2006. 368(9537): p. 763-70.
23. Pearce, N., J. Pekkanen, and R. Beasley, *How much asthma is really attributable to atopy?*. Thorax, 1999. 54: p. 268-72.
24. Manian, P., *Genetics of asthma: a review*. Chest, 1997. 112: p. 1397-1408.
25. Mallia P, Johnston SL. *Respiratory viruses: do they protect from or induce asthma?* Allergy. 2002 Dec;57(12):1118-29.

26. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. Journal of Immunology, 1986. 136: p. 2348-57.
27. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. New England Journal of Medicine, 1992. 326: p. 298-304.
28. Humbert, M., et al., *IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 154(154): p. 1497-504.
29. Robinson, D.S., et al., *Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1993. 92: p. 397-403.
30. Barnes, P.J., *Pathophysiology of asthma*. In: Asthma. Chung F, Fabbri LM, eds. Sheffield. European Respiratory Monograph, 2003. 23: p. 84-113.
31. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. *Airway remodeling in asthma*. Chest. 2003 Mar;123(3 Suppl):417S-22S.
32. Sumi Y, Hamid Q. *Airway remodeling in asthma*. Allergol Int. 2007 Dec;56(4):341-8. Epub 2007 Nov 1.
33. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, la Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G, Bousquet J. *Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Aug;156(2 Pt 1):591-9.
34. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, Mautino G, D'accardi P, Bousquet J, Bonsignore G. *Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med. 1998 Dec;158(6):1945-50
35. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). *Global strategy for diagnosis, management and prevention of COPD*, 2008. Available at: <http://www.goldcopd.org>. Accessed November, 2010.
36. Giovanni Bonsignore e Vincenzo Bellia. *Malattie dell'apparato respiratorio*. McGraw-Hill, 3^a edizione; capitolo 17: 241-61.

37. Claudio Rugarli. *Medicina interna sistematica*. Masson, 5^a edizione; Parte seconda, capitolo 16: 326-33.
38. Rabe K. F., Hurd S., Anzueto A., et al. *Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007; 176: 532-55.
39. Viegi G., Pistelli F., Sherrill D. L., et al. *Definition, epidemiology and natural history of COPD*. European Respiratory Journal, 2007; 30(5): 993-1013.
40. Jindal S. K., Aggarwal A. N., Chaudhry K., et al. *A multicentric study on epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease and its relationship with tobacco smoking and environmental tobacco smoke exposure*. The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences, 2006; 48(1): 23-9.
41. Hogg J. C., Chu F., Utokaparch S., et al. *The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease*. The New England Journal of Medicine, 2004; 350(26): 2645-53.
42. Burgel, P.R. and J.A. Nadel, *Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium*. Thorax, 2004. 59(11): p. 992-6.
43. Baraldo S., Lokar Oliani K., Turato G., et al. *The role of lymphocytes in the pathogenesis of asthma and COPD*. Current Medicinal Chemistry, 2007; 14(21): 2250-6.
44. Majo J., Ghezzi H. and Cosio M. G. *Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema*. European Respiratory Journal, 2001; 17(5): 946-53.
45. O' Donnell D. E., Revill S. M. and Webb K. A. *Dynamic hyperinflation and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2001; 164(5): 770-7.
46. Barberà J. A., Peinado V. I. and Santos S. *Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease*. European Respiratory Journal, 2003; 21(5): 892-905.
47. Hogg, J.C., et al., *The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2004. 350: p. 2645-53.
48. Agustí, A., et al., *Hypothesis: does COPD have an autoimmune component?* Thorax, 2003. 58(10): p. 832-4.

49. Birring, S.S., et al., *Clinical, radiologic, and induced sputum features of chronic obstructive pulmonary disease in nonsmokers: a descriptive study*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. 166(8): p. 1078-83.
50. Baraldo, S., et al., *The Role of Lymphocytes in the Pathogenesis of Asthma and COPD*. Curr Med Chem, 2007. 14(21): p. 2250-6.
51. Majo, J., H. Ghezzi, and M.G. Cosio, *Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema*. Eur Respir J, 2001. 17(5): p. 946-53.
52. Calabrese, F., et al., *Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema*. Respir Res, 2005. 6: p. 14.
53. Liu, A.N., et al., *Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor-alpha: relative insensitivity to Fas ligand*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. 20(5): p. 849-58.
54. Marti S., Munoz X., Rios J., et al. *Body weight and comorbidity predict mortality in COPD patients treated with oxygen therapy*. European Respiratory Journal, 2006; 27(4): 689-96.
55. Tonnesen P., Carrozzi L., Fagerström K. O., et al. *Smoking cessation in patients with respiratory disease: a high priority, integral component of therapy*. European respiratory Journal, 2007; 29(2): 390-417.
56. Sanjay Sethi M. D. and Timothy F. Murphy M. D. *Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease*. The New England Journal of Medicine, 2008; 359: 2355-65.
57. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, Miller B, Lomas DA, Agusti A, Macnee W, Calverley P, Rennard S, Wouters EF, Wedzicha JA; *Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators*. *Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med. 2010 Sep 16;363(12):1128-38.
58. Andrea K. Johnston and David M. Mannino. *Epidemiology of COPD exacerbation*. Lung Health in Health and Disease, ed Wedzicha J. and Martinez F.; Informa Health Care: New York, 2009; 228: 15-26.

59. Himanshu Desai and Sanjay Sethi. *Do airway bacteria cause COPD exacerbations?* Lung Health in Health and Disease, ed Wedzicha J. and Martinez F.; Informa Health Care: New York, 2009; 228: 121-27.
60. J. K. Quint and Jadwiga A. Wedzicha. *Role of respiratory viral infection at exacerbation.* Lung Health in Health and Disease, ed Wedzicha J. and Martinez F.; Informa Health Care: New York, 2009; 228: 111-18.
61. Bhowmik, A., et al., *Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations.* Thorax, 2000. 55(2): p. 114-20.
62. Saetta, M., et al., *Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations.* Am J Respir Crit Care Med, 1994. 150(6 Pt 1): p. 1646-52.
63. Zhu, J., et al., *Exacerbations of Bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. 164(1): p. 109-16.
64. Papi, A., et al., *Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations.* Am J Respir Crit Care Med, 2006. 173(10): p. 1114-21.
65. Tsoumakidou, M., et al., *Changes in sputum T-lymphocyte subpopulations at the onset of severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.* Respir Med, 2005. 99(5): p. 572-9.
66. Wedzicha, J.A. and G.C. Donaldson, *Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.* Respir Care, 2003. 48(12): p. 1204-13; discussion 1213-5.
67. Roland, M., et al., *Sputum and plasma endothelin-1 levels in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.* Thorax, 2001. 56(1): p. 30-5.
68. Pratico, D., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2alpha-III, an index of oxidant stress.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. 158(6): p. 1709-14.
69. Dev, D., et al., *Value of C-reactive protein measurements in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.* Respir Med, 1998. 92(4): p. 664-7.
70. Wilkinson T. M., Patel I. S., Wilks M., et al. *Airway bacterial load and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2003; 167(8): 1090-5.

71. Banerjee D., Khair O. A. and Honeybourne D. *Impact of sputum bacteria on airway inflammation and health status in clinical stable COPD*. European Respiratory Journal, 2004; 23(5): 685-91.
72. Marco Contoli, Gaetano Caramori, Brunilda Marku, Alberto Papi and Anita Pandit. *Interactions of airway pathogens and inflammatory processes*. Lung Health in Health and Disease, ed Wedzicha J. and Martinez F.; Informa Health Care: New York, 2009; 228: 129-35.
73. Global Initiative for Asthma (GINA), *Global strategy for Asthma Management and Prevention*. NHLBI/WHO Workshop report. 2002. NIH Publication 02-3659.: p. Last Update 2008
74. Weiss, K.B. and S.D. Sullivan, *The health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact*. J Allergy Clin Immunol, 2001. 107(1): p. 3-8.
75. Hoskins, G., et al., *Risk factors and costs associated with an asthma attack*. Thorax, 2000. 55(1): p. 19-24.
76. Caramori, G., et al., *Morte per asma. Parte I: fenotipi clinici, epidemiologia e fattori di rischio*. Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio, 2005. 20: p. 25-36.
77. Caramori, G., et al., *Morte per asma. Parte ii: patogenesi, quadro anatomo-patologico, diagnosi differenziale e prevenzione*. Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio, 2005. 20: p. 129-143.
78. Greening, A.P., et al., *Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid*. Allen & Hanburys Limited UK Study Group. Lancet, 1994. 344(8917): p. 219-24.
79. Pauwels, R.A., et al., *Early intervention with budesonide in mild persistent asthma: a randomised, double-blind trial*. Lancet, 2003. 361(9363): p. 1071-6.
80. Doull, I.J.M., et al., *Effect of inhaled corticosteroids on episodes of wheezing associated with viral infection in school age children: randomised double blind placebo controlled trial*. BMJ, 1997. 315(7112): p. 858-862.
81. Xiang, X., et al., *Comparison of three methods for respiratory virus detection between induced sputum and nasopharyngeal aspirate specimens in acute asthma*. J Virol Methods, 2002. 101(1-2): p. 127-33.

82. Falsey, A.R., M.A. Formica, and E.E. Walsh, *Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness*. J Clin Microbiol, 2002. 40(3): p. 817-20.
83. Johnston, S.L., et al., *Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children*. BMJ, 1995. 310(6989): p. 1225-9.
84. Nicholson, K.G., J. Kent, and D.C. Ireland, *Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults*. Bmj, 1993. 307(6910): p. 982-6.
85. Wark, P.A., et al., *Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma*. Eur Respir J, 2002. 19(1): p. 68-75.
86. Tan, W.C., et al., *Epidemiology of respiratory viruses in patients hospitalized with near-fatal asthma, acute exacerbations of asthma, or chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Med, 2003. 115(4): p. 272-7.
87. Johnston, S.L., et al., *The relationship between upper respiratory infections and hospital admissions for asthma: a time-trend analysis*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 154: p. 654-60.
88. Nichols, T., A. Hansell, and D. Strachan, *The contribution of 'holiday deaths' to seasonal variations in asthma mortality in England and Wales*. Clin Exp Allergy, 1999. 29(10): p. 1415-7.
89. Campbell, M.J., et al., *Age specific trends in asthma mortality in England and Wales, 1983-95: results of an observational study*. Bmj, 1997. 314(7092): p. 1439-41.
90. Campbell, M.J., S.T. Holgate, and S.L. Johnston, *Trends in asthma mortality. Data on seasonality of deaths due to asthma were omitted from paper but editorial's author did not know*. Bmj, 1997. 315(7114): p. 1012.
91. Gern, J.E. and W.W. Busse, *The role of viral infections in the natural history of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2000. 106(2): p. 201-12.
92. Bardin, P.G., et al., *Peak expiratory flow changes during experimental rhinovirus infection*. Eur Respir J, 2000. 16(5): p. 980-5.
93. Contoli, M., et al., *Mechanisms of respiratory virus-induced asthma exacerbations*. Clinical & Experimental Allergy, 2005. 35(2): p. 137-145.

94. Corne, J.M., et al., *Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study*. Lancet, 2002. 359(9309): p. 831-4.
95. Grunberg, K., et al., *Experimental rhinovirus 16 infection causes variable airway obstruction in subjects with atopic asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. 160(4): p. 1375-80.
96. Message, S.D., et al., *Rhinovirus-induced lower respiratory illness is increased in asthma and related to virus load and Th1/2 cytokine and IL-10 production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(36): p. 13562-7.
97. Samuel, C.E., *Antiviral Actions of Interferons*. Clin. Microbiol. Rev., 2001. 14(4): p. 778-809.
98. Clemens, M.J., *Interferons and apoptosis*. J Interferon Cytokine Res, 2003. 23(6): p. 277-92.
99. Basler, C.F. and A. Garcia-Sastre, *Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion*. Int Rev Immunol, 2002. 21(4-5): p. 305-37.
100. Katze, M.G., Y. He, and M. Gale, Jr., *Viruses and interferon: a fight for supremacy*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(9): p. 675-87.
101. Biron, C.A., *Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections*. Semin Immunol, 1998. 10(5): p. 383-90.
102. Contoli, M., et al., *Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations*. Nat Med, 2006. 12(9): p. 1023-6.
103. Wark, P., et al., *Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus*. J Exp Med, 2005. 201: p. 937-47.
104. Coyle, A.J., et al., *virus-specific CD8+ cells can switch to interleukin 5 production and induce airway eosinophilia*. J Exp Med, 1995. 181: p. 1229-1233.
105. Papadopoulos, N.G., et al., *A defective type 1 response to rhinovirus in atopic asthma*. Thorax, 2002. 57(4): p. 328-32.
106. Gern, J.E., et al., *Relationship of upper and lower airway cytokines to outcome of experimental rhinovirus infection*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(6): p. 2226-31.
107. Brooks, G.D., et al., *Rhinovirus-induced interferon-gamma and airway responsiveness in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 168(9): p. 1091-4.

108. Mannino DM, Gagnon RC, Petty TL, Lydick E. *Obstructive lung disease and low lung function in adults in the United States: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994*. Arch Intern Med 2000; 160: 1683-9.
109. Celli BR, Snider GL, Heffner J, Tiej B, Ziment I, Make B, Braman S, Olsen G, Philips Y. *Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease: American Thoracic Society*. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:S77–S121.
110. *BTS guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. The COPD guidelines group of the standards of Care Committee of the BTS (British Thoracic Society)* Thorax 1997; 52:S1-S28.
111. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. *Inflammatory mediators of asthma: an update*. Pharmacol Rev. 1998 Dec;50(4):515-96.
112. Homer RJ, Elias JA. *Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms*. Physiology (Bethesda). 2005 Feb;20:28-35.
113. Ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. *Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2001;164:744-8.
114. Birkland TP, Cheavens MD, Pincus SH. *Human eosinophils stimulate DNA synthesis and matrix production in dermal fibroblasts*. Arch Dermatol Res. 1994;286(6):312-8.
115. Shock A, Rabe KF, Dent G, Chambers RC, Gray AJ, Chung KF, Barnes PJ, Laurent GJ. *Eosinophils adhere to and stimulate replication of lung fibroblasts 'in vitro'*. Clin Exp Immunol. 1991 Oct;86(1):185-90.
116. Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, Hamid Q. *Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol. 1997 Sep;17(3):326-33.
117. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. *Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1720–1745.
118. Jeffery PK: *Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma*. Giles F. Filley Lecture. Chest 2000;117:251S-260S.

119. Ollerenshaw SL, Woolcock AJ. *Charateristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subject with chronic airflow limitation*. Am Rev Respir Dis 1992;145:922-927.
120. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli , Turato G, Mapp CE, Pieno M, Zancuoghi G, Del rete G, Fabbri LM. *Airway eosinophilia and exression of interleukin-5 protein in asthma and exacerbations of chronic bronchitis*. Clin Exp Allergy 1996;26:766-774.
121. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. *Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma*. Am J Respir Crit Care Med 1996;153:530-534.
122. Vignola AM, Chanez , Chiapara G, Siena L, Merendino A, Reina C, Gagliardo R, Profita M, Bousquet J, Bonsignore G. *Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages and T lymphocytes in mucosal biopsy spicemens of atients with asthma ancd chronic bronchitis*. J Allergy Clin Immunol 1999;103:563-573.
123. Barnes PJ. *Chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med 2000;343:269-280.
124. Saetta M, Turato G, Baraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, Maestrelli P, Cavallesco G, Papi A, Fabbri LM. *Globet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation*. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1016-1021.
125. Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, Papi A et al. *Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease: American Thoracic Society*. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167 (3):418-424
126. Burrows B, Bloom JW, Traver GA, Cline MG. *The course and prognosis of different forms of chronic airways obstruction in a samle from the general population*. N Engl J Med 1987; 317: 1309-1314.
127. Kerstjens HA, Brand PL, Hughes MD, Robinson NJ, Postma DS, Sluiter HJ, Bleecker ER, Dekhijzen PN, de Jong PM, Mengelers HJ, et al. *A comparison of bronchodilator therapy with or without inhaled corticosteroid therapy for obstructive airway disease: Dutch Chronic Non-Specific Lung Disease Study Grou*. N Engl J Med 1992;327:1413-1419.
128. Kharnitov SA, Barnes PJ. *Clinical aspects of exhaled nitric oxide*. Eur Respir J 2000;16:781-792.

129. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al. *Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma.* Thorax 1992;47:25-29.
130. Maestrelli P, Calcagni PG, Saetta M, et al. *Sputum eosinophilia after asthmatic responses induced by isocyanates in sensitized subjects.* Clin Exp Allergy 1994;24:29-34.
131. Maestrelli P, Calcagni PG, Saetta M, et al. *Sputum eosinophilia after asthmatic responses induced by isocyanates in sensitized subjects.* Clin Exp Allergy 1994;24:29-34.
132. Gibson PG, Girgis-Gabardo A, Morris MM et al. *Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis.* Thorax 1989;44:693-699.
133. Popov T, Gottschalk R, Kolendowicz R, Dolovich J, Poweres P, Hargreave FE. *The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination.* Clin Exp Allergy 1994;24:778-783
134. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen GA. *15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma.* N Engl J Med 1998;339:1194-200.
135. James AL, Palmer LJ, Kicic E, Maxwell PS, Lagan SE, Ryan GF, et al. *Decline in lung function in the Besselton health study. The effects of asthma and cigarette smoking.* Am J Respir Crit Care Med 2005;171:109-14.
136. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, et al. *Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease.* N Engl J Med 2007;356:775-89.
137. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, et al. *A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease.* N Engl J Med 2008;359: 1543-54.
138. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, et al. *Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers.* Am J Respir Crit Care Med 1998;158:1277-85.
139. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, et al. *Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD.* Thorax 2004;59:837-42.
140. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. *Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease.* Thorax 2002;57:847-52.

141. Papi, A., et al., *Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2006. 3: p. 245-251.
142. Hogg, J.C., et al., *The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2004. 350: p. 2645-53.
143. Miller, M.R., et al., *General considerations for lung function testing*. Eur Respir J, 2005. 26(1): p. 153-61.
144. Miller, M.R., et al., *Standardisation of spirometry*. Eur Respir J, 2005. 26(2): p. 319-38.
145. Ferrer, M., et al., *Interpretation of quality of life scores from the St George's Respiratory Questionnaire*. Eur Respir J, 2002. 19(3): p. 405-13.
146. Calverley, P.M., et al., *Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2007. 356(8): p. 775-89.
147. Rello J., Rodriguez A., Torres A., et al. *Implications of COPD in patients admitted to the intensive care unit by community-acquired pneumonia*. European Respiratory Journal, 2006; 27(6): 1210-6.
148. Restrepo M. I., Mortensen E. M., Pugh J. A., et al. *COPD is associated with increased mortality in patients with community-acquired pneumonia*. European Respiratory Journal, 2006; 28(2): 346-51.
149. Singanayagam A., Chalmers J. D. and Hill A. T. *Inhaled corticosteroids and risk of pneumonia: evidence for and against the proposed association*. QJM, 2010; 103: 379-85.
150. Amory-Rivier C. F., Mohler J., Bédos J. P., et al. *Nuclear factor-kappa B activation in mouse lung lavage cells in response to Streptococcus pneumoniae pulmonary infection*. Critical Care Medicine, 2000; 28(9): 3249-56.
151. Sha W. C., Liou H. C., Tuomanen E. I., et al. *Targeted disruption of the p50 subunit of NF-Kappa B leads to multifocal defects in immune responses*. Cell., 1995; 80(2): 321-30.
152. Calverley P. M., Anderson J. A., Celli B., et al. *Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease*. The New England Journal of Medicine, 2007; 356(8): 775-89.
153. Kardos P., Wencker M., Glaab T., et al. *Impact of salmeterol/fluticasone propionate versus salmeterol on exacerbations in severe chronic obstructive pulmonary disease*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007; 175(2): 144-9.

154. Wedzicha J. A., Calverley P. M., Seemungal T. A., et al. *The prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations by salmeterol/fluticasone propionate or tiotropium bromide*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2008; 177(1): 19-26.
155. Drummond M. B., Dasenbrook E. C., Pitz M. W., et al. *Inhaled corticosteroids in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis*. The Journal of the American Medical Association, 2008; 300(20): 2407-16.
156. Singh S., Amin A. V. and Loke Y. K. *Long-term use of inhaled corticosteroids and the risk of pneumonia in chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis*. Archives of Internal Medicine, 2009; 169(3): 219-29.
157. Sin D. D., Tashkin D., Zhang X., et al. *Budesonide and the risk of pneumonia: a meta-analysis of individual patient data*. Lancet, 2009; 374(9691): 712-9.
158. Ernst P., Gonzalez A. V., Brassard P., et al. *Inhaled corticosteroid use in chronic obstructive pulmonary disease and the risk of hospitalization for pneumonia*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007; 176: 162-66.
159. Patel I. S., Seemungal T. A., Wilks M., et al. *Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character and severity of COPD exacerbations*. Thorax, 2002; 57(9): 759-64.
160. Barbato, A., et al., *Epithelial Damage and Angiogenesis in the Airways of Children with Asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 174: p. 975-981. 39.
161. *Workshop summary and guidelines: investigative use of bronchoscopy, lavage, and bronchial biopsies in asthma and other airway diseases*. J Allergy Clin Immunol, 1991. 88(5): p. 808-14.

Fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease: 5-year follow-up

Marco Contoli, MD, PhD,^a Simonetta Baraldo, PhD,^b Brunilda Marku, MD,^a Paolo Casolari, PhD,^a John A. Marwick, PhD,^{a,d} Graziella Turato, PhD,^b Micaela Romagnoli, MD, PhD,^c Gaetano Caramori, MD, PhD,^a Marina Saetta, MD,^b Leonardo M. Fabbri, MD,^e and Alberto Papi, MD^a Ferrara, Padua, Forli, and Modena, Italy, and London, United Kingdom

Background: Both smokers and patients with asthma can experience fixed airflow obstruction, which is associated with distinctive patterns of airway pathology. The influence of fixed airflow obstruction on the prognosis of these patients is unknown.

Objective: We sought to investigate lung function decline and exacerbations in a 5-year prospective study of subjects with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We also sought to explore correlations between functional, pathological, and clinical features.

Methods: Patients with fixed airflow obstruction due to asthma (n = 16) or COPD (n = 21) and a control group of asthmatic patients with fully reversible airflow obstruction (n = 15) were followed for 5 years.

Results: The rates of decline in FEV₁ were similar in patients with fixed airflow obstruction caused by asthma (-49.7 ± 10.6 mL/y) or COPD (-51.4 ± 9.8 mL/y) and were higher than in asthmatic patients with reversible airflow obstruction (-18.1 ± 10.1 mL/y, $P < .01$). Exacerbation rates were also higher in patients with fixed airflow obstruction caused by asthma (1.41

± 0.26 per patient-year) or COPD (1.98 ± 0.3 per patient-year) compared with those seen in asthmatic patients with reversible airflow obstruction (0.53 ± 0.11 per patient-year, $P < .01$). Baseline exhaled nitric oxide levels and sputum eosinophil counts correlated with the FEV₁ decline in asthmatic patients with fixed airflow obstruction. By contrast, baseline sputum neutrophil counts, emphysema scores, comorbidities, and exacerbation frequency correlated directly and pulmonary diffusion capacity correlated inversely with the FEV₁ decline in patients with COPD.

Conclusion: In both patients with asthma and those with COPD, fixed airflow obstruction is associated with increased lung function decline and frequency of exacerbations. Nevertheless, the decline in lung function entails the specific pathological and clinical features of the underlying diseases. (J Allergy Clin Immunol 2010;125:830-7.)

Key words: Asthma, chronic obstructive pulmonary disease, airway inflammation, lung function, exacerbations, comorbidities, natural history

From ^athe Research Centre on Asthma and COPD, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Ferrara; ^bthe Department of Cardiac, Thoracic, and Vascular Sciences, University of Padova; ^cInterventional Pulmonology, Department of Thoracic Diseases, Pierantoni-Morgagni Hospital, Forli; ^dthe National Heart and Lung Institute, Airways Disease Section, Imperial College London; and ^ethe Department of Respiratory Diseases, University of Modena and Reggio Emilia, Modena.

Supported by the Italian Ministry of Health and the Italian Ministry of Education (MURST).

Disclosure of potential conflict of interest: M. Contoli has received consulting fees from Chiesi Farmaceutici and has received lecture fees from Boehringer Ingelheim and AstraZeneca. S. Baraldo has received lecture fees from Boehringer Ingelheim. M. Romagnoli has received lecture fees from AstraZeneca. G. Caramori has received lecture fees from Sigma Tau, has received research support from Novartis, and has served as an expert witness for GlaxoSmithKline. M. Saetta has received lecture fees from AstraZeneca, Farmindustria, GlaxoSmithKline, Abbott Laboratories, and Boehringer Ingelheim and has received research support from GlaxoSmithKline and AstraZeneca. L. M. Fabbri has received fees for lecturing, consultancies, and advisory boards from Nycomed, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Chiesi Farmaceutici, GlaxoSmithKline, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Roche, and Pfizer and has received research support from Chiesi Farmaceutici, Nycomed, Boehringer Ingelheim, Pfizer, Roche, and Novartis. A. Papi has received fees for lecturing, consultancies, and the advisory board from Chiesi Farmaceutici; fees for lecturing and consultancies from GlaxoSmithKline; fees for lecturing from AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, and Merck Sharp & Dohme; and research support from AstraZeneca, Chiesi Farmaceutici, Boehringer Ingelheim, and Merck Sharp & Dohme. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

Received for publication June 25, 2009; revised November 17, 2009; accepted for publication January 5, 2010.

Available online March 15, 2010.

Reprint requests: Alberto Papi, MD, Research Centre on Asthma and COPD, University of Ferrara, via Savonarola 9, 44100, Ferrara, Italy. E-mail: papa@unife.it. 0091-6749/\$36.00

© 2010 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
doi:10.1016/j.jaci.2010.01.003

Asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are 2 distinct obstructive lung diseases with distinctive clinical presentations. Classically, asthma is characterized by airflow limitation that is reversible spontaneously or after adequate therapy,¹ whereas COPD is characterized by airflow limitation that is never fully reversible and is usually progressive, regardless of adequate therapy.² Distinctive patterns of airway inflammation and structural remodeling/derangement are constitutive parts of the pathological picture of the 2 diseases.³⁻⁵

A proportion of asthmatic patients experience a fixed airflow obstruction that persists despite optimal pharmacologic treatment.⁶ Mannino et al⁷ found that up to 30% of subjects with airflow obstruction have a history of asthma rather than COPD, but reversibility was not assessed in this epidemiologic survey. Data about the exact prevalence of fixed airflow obstruction among asthmatic patients are limited, with some studies reporting rates of about 20%⁸ and others reporting a prevalence of irreversible airflow obstruction among patients with severe asthma as high as 49%.⁹

Although asthmatic patients have been reported to have a faster lung function decline compared with that seen in healthy subjects,¹⁰ very little is known on the rate of decline in rigorously characterized aged-matched asthmatic patients and patients with COPD. In particular, the natural course of lung function decline in patients with fixed airflow obstruction and history of asthma without exposure to tobacco smoking is unknown. These patients deserve clinical and research attention because their disease is usually misjudged, their prognosis is unknown, and even treatment has never been properly explored. Indeed, asthmatic patients

Abbreviations used

COPD: Chronic obstructive pulmonary disease
eNO: Exhaled breath nitric oxide
K_{CO}: Pulmonary diffusion capacity
ROC: Receiver operating characteristic

with fixed airflow obstruction are excluded from clinical trials because they cannot be labeled as having asthma or COPD.

We recently investigated a cohort of subjects with irreversible airflow obstruction and a history of asthma or COPD to evaluate whether the overlap between these 2 conditions is limited to spirometric data (ie, fixed airflow obstruction) or whether it involves also airway pathology and response to treatment.¹¹ We found 2 distinctive profiles, with the same type of irreversible airflow obstruction being associated with the pathological features typical of asthma or COPD, depending on the clinical history of the patients.¹¹ Compared with patients with COPD, asthmatic patients with a similar fixed airflow obstruction had a more intense eosinophilic inflammation in the airways, higher exhaled nitric oxide levels, lower residual volume, higher diffusing capacity, lower high-resolution computed tomographic scan emphysema scores, and greater reversibility to treatment.¹¹

In the present study we report the results of 5-year follow-up of this cohort of patients previously described cross-sectionally.¹¹ We first evaluated the rate of lung function decline and the frequency of exacerbations in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or COPD. Second, in the search for prognostic indices, we investigated the relationships between lung function decline, airway inflammation, and clinical phenotypes in these populations.

METHODS

Study population

The study population consisted of the previously described¹¹ cohort of patients with fixed airflow obstruction due to asthma (n = 19) or COPD (n = 27). For consistency, in the present follow-up study we maintained the same terminology: fixed airflow obstruction due to asthma or COPD. The presence of fixed airflow obstruction, both in patients with asthma and those with COPD, was defined as a postbronchodilator FEV₁/forced vital capacity ratio of less than 70% in baseline stable conditions irrespective of the magnitude of FEV₁ changes after administration of short-acting bronchodilator.^{11,12} In the original cross-sectional study (recruitment)¹¹ the presence of fixed airflow obstruction was not only evaluated after bronchodilator testing (200 µg of albuterol), but it also persisted after a short course of systemic corticosteroids (15-day course with oral prednisone, 50 mg/d).¹¹

The inclusion criteria of patients with fixed airflow obstruction were previously described.¹¹ Briefly, asthmatic patients had a history of previous recurrent episodes of wheezing, dyspnea, chest tightness, and/or cough; had previously documented variable airflow obstruction as a bronchodilator response; and were either lifelong nonsmokers or ex-smokers with a history of less than 5 cumulative pack-years. Patients with COPD had a history of chronic respiratory symptoms (dyspnea, productive cough, or both), a history of smoking with greater than 20 cumulative pack-years, and a documented absence of reversible airflow obstruction in the past.¹¹

A third group (n = 15), which was not evaluated in the original cross-sectional study,¹¹ consisting of asthmatic patients with similar prebronchodilator FEV₁ but with fully reversible airflow obstruction¹ (defined as a postbronchodilator FEV₁/forced vital capacity ratio > 70%) and matched for age and prebronchodilator FEV₁ with the other 2 groups, was included in the present study for comparison of lung function decrease.

After the cross-sectional evaluation (recruitment visit¹¹), patients were asked to enter the longitudinal study, and informed consent was obtained. Those who accepted underwent the baseline visit of the longitudinal study after 2 to 3 months. In parallel, the third group (asthma with reversible airflow obstruction) was recruited and enrolled in the study.

From October 1998 to November 2005, patients belonging to these cohorts were regularly followed for 5 years and visited every 12 months. Patients were seen in stable condition and free from exacerbations for at least 3 months. They underwent physical examinations and lung function tests, exhaled breath nitric oxide (eNO) measurements, and induced sputum, as previously described.^{13,14} For diagnostic purposes, bronchial responsiveness and atopic status were evaluated at recruitment, according to standardized procedures.^{15,16}

Adverse events and exacerbations requiring medical intervention were recorded, comorbid conditions other than asthma and COPD were also assessed at each visit, and the Charlson Index was computed at baseline.¹⁷ Medical records were used to capture asthma exacerbations requiring emergency treatment or hospitalization or the need for oral steroids¹⁸⁻²⁰ and COPD exacerbations requiring treatment with antibiotic agents, systemic corticosteroids, hospitalization, or a combination of these.²¹⁻²³

The study conformed to the Declaration of Helsinki, the work was approved by the institutional ethics committee, and informed written consent was obtained from each subject.

Lung function

Pulmonary function tests (Biomedin Spirometer, Padova, Italy), including spirometry, total lung capacity (assessed by means of the helium dilution technique), measurement of residual volume, and pulmonary diffusion capacity (K_{CO}), were performed as previously described,^{11,13} according to published guidelines.^{24,25}

Comorbidities

The Charlson index of comorbidity, which assigns to each disease a score that is proportional to the disease-related risk of death,¹⁷ was evaluated for each patient at baseline, and it was correlated with lung function decline. In accordance with recent literature,^{26,27} the computed Charlson Index was not adjusted for age¹⁷ because the 3 groups of patients were age matched, and we did not include chronic respiratory disorders in the patients' scores because by definition all patients recruited in the study had one respiratory disorder (either asthma or COPD). At each visit, comorbidities other than asthma and COPD were recorded. A score from 0 (none) to 5 (cardiovascular disease, cancer, metabolic diseases, skeletal disorders, and others) was attributed to each patient at the end of the study.

Sputum

Induced sputum was collected and analyzed, as previously described.¹¹ Sputum plugs arising from the lower respiratory tract were selected for sputum cell counts.¹⁴

Chest high-resolution computed tomography

High-resolution computed tomographic scans of the chest were done, and the emphysema score was determined at the beginning of the study, as previously reported.^{11,28} Emphysema scores from the 31 patients of the cross-sectional study (21 with a history of COPD and 10 with a history of asthma) who completed the 5-year follow-up were available for analyses.

Statistical analysis

Lung function decline within groups was assessed by means of 1-way ANOVA. Differences at each time point from baseline were evaluated by using the *t* test. Comparison of lung function decreases between groups were performed by using 2-way ANOVA. At each time point, differences between groups were calculated by using the unpaired *t* test. Changes at the end of the study versus baseline were evaluated by using paired *t* tests or Wilcoxon signed-rank tests or the χ^2 test, as appropriate. Comparisons among groups were evaluated by using ANOVA and the Student *t* test or Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test or the χ^2 test, as appropriate.

The Bonferroni correction was used for multiple comparisons. Linear regression analysis was used when appropriate, and the Pearson test was used

TABLE I. Demographics and clinical characteristics

Characteristic	Patients with fixed airflow obstruction, asthma		Patients with fixed airflow obstruction, COPD		Asthma with reversible airflow obstruction	
	Baseline	End of study	Baseline	End of study	Baseline	End of study
No. of patients	16		21		15	
Age (y)	64.5 ± 2.1		66.2 ± 1.1		63.9 ± 2.7	
Sex (M/F)	10/6		17/4		10/5	
Smoking history (pack-years)	13 NS, 3 exS (0.9 ± 0.4)		19 exS, 2 S (41.8 ± 3.8)*		13 NS, 2 exS (0.7 ± 0.2)	
Positive skin prick test response, no. (%)	15 (93)‡		1 (5)		12 (80)‡	
FEV ₁ (L)	1.63 ± 0.08	1.47 ± 0.11§	1.60 ± 0.10	1.37 ± 0.10§	1.71 ± 0.14	1.65 ± 0.13
FEV ₁ (% predicted)	54.7 ± 2.4	51.0 ± 3.1§	56.6 ± 2.2	51.9 ± 2.9§	58.9 ± 2.6	58.5 ± 2.5
FEV ₁ after bronchodilator (L)	1.88 ± 0.10	1.63 ± 0.09§	1.73 ± 0.10	1.47 ± 0.12§	2.18 ± 0.09	2.09 ± 0.12¶
FEV ₁ after bronchodilator (% predicted)	63.4 ± 2.8	56.6 ± 3.0§	61.1 ± 2.1	55.2 ± 2.8§	75.1 ± 2.1¶	74.2 ± 2.6¶
FEV ₁ /FVC ratio after bronchodilator (%)	53.2 ± 1.7	53.0 ± 1.3	51.4 ± 2.1	50.4 ± 2.3	72.1 ± 1.9¶	72.1 ± 2.0¶
ΔFEV ₁ after bronchodilator (mL)	246 ± 32	228.6 ± 29	124 ± 15	115 ± 19	461 ± 45	432 ± 38
ΔFEV ₁ after bronchodilator (% predicted)	8.4 ± 1.6	8.1 ± 1.1	4.4 ± 1.0	4.4 ± 1.2	15.8 ± 1.8¶	14.9 ± 1.4¶
RV (% predicted)	105.8 ± 5.2	111.4 ± 6.7	132.8 ± 6.3*	144.9 ± 7.1*§	102.5 ± 5.1	100.3 ± 4.9
K _{CO} (% predicted)	82.4 ± 3.5	73.8 ± 3.9§	61.1 ± 4.8†	43.5 ± 6.1§,†	85.7 ± 4.9	88.9 ± 5.2
eNO (ppb)	37.1 ± 6.7‡	33.9 ± 7.4‡	10.9 ± 1.1	9.1 ± 1.3	28 ± 9.1‡	21 ± 7.9‡
Inhaled steroids, no. (%)	16 (100)	16 (100)	17 (80)	19 (90)	12 (80)	15 (100)
Systemic steroids, no. (%)	0 (0)	1 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Inhaled long-acting β ₂ -agonist, no. (%)	15 (94)	16 (100)	21 (100)	21 (100)	13 (87)	14 (93)
Inhaled short-acting antimuscarinic, no. (%)	0 (0)	0 (0)	7 (33)*	1 (5)§	0 (0)	0 (0)
Inhaled long-acting antimuscarinic, no. (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (28)*,§	0 (0)	0 (0)

exS, Ex-smoker; F, female; FVC, forced vital capacity; K_{CO}, carbon monoxide transfer coefficient; M, male; NS, nonsmoker; RV, residual volume; S, smoker.

**P* < .05 versus patients with fixed airflow obstruction due to asthma and versus patients with asthma with reversible airflow obstruction.

†*P* < .01 versus patients with fixed airflow obstruction due to asthma and versus patients with asthma with reversible airflow obstruction.

‡*P* < .05 versus patients with fixed airflow obstruction due to COPD.

§*P* < .05 versus baseline.

||*P* < .05 and ¶*P* < .01 versus patients with fixed airflow obstruction due to COPD or asthma.

to investigate correlations. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed for inflammatory biomarkers to define their capability to predict (predictive value) lung function decrease and other clinically relevant outcomes. The area under the ROC curves was determined, and a value of greater than 0.80 was considered a good discrimination.²⁹ ROC curve analysis allowed (sensitivity vs 1 minus specificity) selection of the best discriminating cutoff point of each variable.

P values of less than .05 were considered significant. In the case of multiple comparisons, the reported *P* values refer to analyses adjusted by using the Bonferroni correction. All analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc, La Jolla, Calif).

RESULTS

Of the 46 patients with fixed airflow obstruction constituting the population of the original cross-sectional study,¹¹ 80% completed the 5-year follow-up (21 with a history of COPD and 16 with a history of asthma). Nine patients did not complete the study for the following reasons: 4 died (3 patients with a history of COPD and 1 with a history of asthma, *P* > .5), and 5 patients (3 patients with a history of COPD and 2 with a history of asthma, *P* > .5) refused consent.

Demographic and baseline characteristics of the patients participating in the longitudinal study are summarized in Table I. No difference was found in demographic, functional,

and inflammatory parameters between patients who completed the 5-year follow-up and those of the original cross-sectional cohort.¹¹ The 3 groups of patients were matched for age, sex, and prebronchodilator airflow obstruction. Asthmatic patients with fixed airflow obstruction and patients with COPD had similar postbronchodilator FEV₁. Also, the 3 groups had similar exposure to inhaled corticosteroids and long-acting β₂-agonists.

A proportion of patients with COPD (*n* = 6; 28%) started a regular treatment with the antimuscarinic tiotropium during the follow-up period. These patients were previously treated with short-acting antimuscarinic agents (Table I). We did not find any specific differences between these 6 patients and the remaining 15 patients of the COPD group in any of the outcomes explored.

Lung function changes over 5 years of follow-up

Postbronchodilator FEV₁. Overall, the population with fixed airflow obstruction had a progressive postbronchodilator FEV₁ decline over time (*P* < .001, ANOVA). Mean postbronchodilator FEV₁ decline was −50.1 ± 6.8 mL/y, corresponding to a decline rate of −1.28% ± 0.18% of predicted value per year.

Postbronchodilator FEV₁ declined progressively in patients with fixed airflow obstruction caused by asthma (*P* < .001, ANOVA; Fig 1, A, and Table I). Mean decrease was −49.7 ± 10.6 mL/y

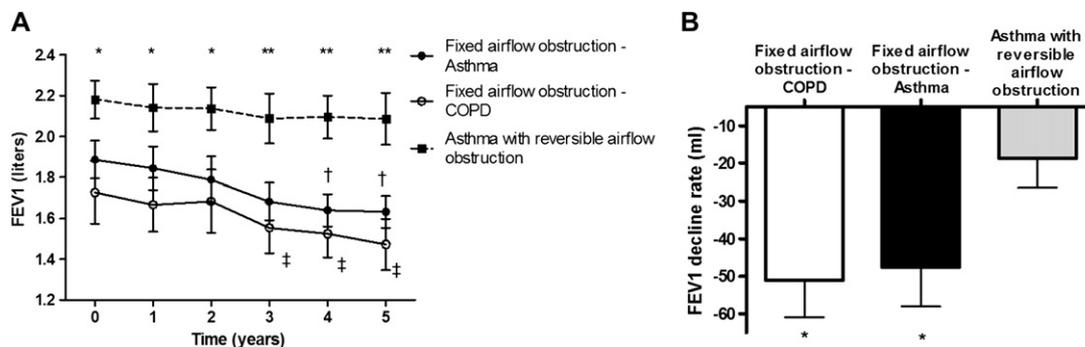


FIG 1. FEV₁ decline rates over 5 years in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or COPD. **A**, Changes in postbronchodilator FEV₁ over the 5-year follow-up. **P* < .05 versus patients with fixed airflow obstruction due to asthma or COPD at the same time point. ***P* < .01 versus patients with fixed airflow obstruction due to asthma or COPD at the same time point. †*P* < .05 versus baseline. ‡*P* < .05 versus baseline. Error bars indicate SEMs. **B**, Mean postbronchodilator FEV₁ decline per year. **P* < .01 versus asthmatic patients with fully reversible airflow obstruction. Error bars indicate SEMs.

(Fig 1, B), corresponding to a decrease rate of $-1.37\% \pm 0.28\%$ of predicted value per year.

In patients with fixed airflow obstruction due to COPD, postbronchodilator FEV₁ declined progressively over time (*P* < .001, ANOVA; Fig 1, A, and Table I). Mean postbronchodilator FEV₁ decline was -51.4 ± 9.8 mL/y (Fig 1, B), corresponding to a decline rate of $-1.19\% \pm 0.24\%$ of predicted value per year.

In asthmatic patients with fully reversible airflow obstruction, postbronchodilator FEV₁ values did not change significantly throughout the study (Fig 1, A). None of the patients with fully reversible airflow obstruction developed fixed airflow obstruction during the 5-year follow-up.

The rate of postbronchodilator FEV₁ decline was similar in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or COPD (*P* = .71), and it was steeper compared with that seen in asthmatic patients with fully reversible airflow obstruction (-18.1 ± 10.1 mL/y, *P* < .01; Fig 1, B).

Other lung function measurements. At the end of the 5-year follow-up, residual volume was not significantly changed from baseline in patients with fixed airflow obstruction caused by asthma, whereas it was significantly increased in those with a history of COPD (Table I). As compared with baseline, the K_{CO} value was significantly reduced after 5 years in patients with fixed airflow obstruction due to either asthma or COPD (Table I). The reduction of K_{CO} percent predicted was significantly lower in asthmatic patients with fixed airflow obstruction ($-8.6\% \pm 2.1\%$ of predicted value) compared with patients with COPD ($-17.63\% \pm 3.5\%$ of predicted value, *P* < .01). During the 5-year study, the control group of asthmatic patients with fully reversible airflow obstruction showed no change in residual volume and K_{CO} (Table I).

Relationships between the rates of FEV₁ decline, lung function measurements, and emphysema scores in patients with fixed airflow obstruction

Among patients with fixed airflow obstruction due to asthma, but not among those with fixed airflow obstruction due to COPD, reversibility to bronchodilator at baseline negatively correlated with FEV₁ decline over 5 years (*P* < .05, *r* = -0.54). In patients with fixed airflow obstruction due to COPD, but not in patients with fixed airflow obstruction due to asthma, there was an inverse correlation between baseline K_{CO} values (percent predicted) and FEV₁ decline rate (*P* < .01, *r* = -0.51), whereas the initial

emphysema score correlated positively with the rate of FEV₁ decline over 5 years (*P* < .05, *r* = 0.47).

The exclusion from the analyses of the 4 asthmatic patients of this group with higher reversibility (ie, response to short-acting β_2 -agonist bronchodilators >200 mL and >12% of predicted value) did not affect any of the results described in this study.

Airway inflammation: 5-year follow-up

Sputum total cell counts did not significantly change during the 5-year follow-up in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or COPD (Table II). Sputum eosinophil counts were significantly higher in patients with fixed airflow obstruction due to asthma than in patients with fixed airflow obstruction due to COPD both at baseline and at the end of the study (Table II). Conversely, sputum neutrophil counts were higher in patients with fixed airflow obstruction due to COPD both at baseline and at the end of the 5-year follow-up (Table II).

In patients with fixed airflow obstruction due to asthma, the percentage of sputum eosinophils decreased over time (*P* < .01, ANOVA), and the reduction was significant from 3 years onward.

Relationships between the rates of FEV₁ decline and baseline airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction

Patients with fixed airflow obstruction due to asthma, but not those with fixed airflow obstruction due to COPD, showed a positive correlation between the rates of decrease in FEV₁ and both the percentage of baseline sputum eosinophils (*P* < .05, *r* = 0.53; Fig 2, A) and baseline eNO levels (*P* < .05, *r* = 0.55). Conversely, the percentage of sputum neutrophils at baseline positively correlated with the rates of FEV₁ decline in patients with fixed airflow obstruction due to COPD (*P* < .05, *r* = 0.49; Fig 2, B) but not due to asthma.

The percentage of sputum eosinophils in patients with fixed airflow obstruction due to asthma and the percentage of sputum neutrophils in patients with COPD were good predictors of accelerated lung function decrease (values of the area under the ROC curves, 0.81 and 0.83, respectively). In asthmatic patients with fixed airflow obstruction, a percentage of sputum eosinophils greater than 6.1% (best cutoff point with a sensitivity of 0.88 and a specificity of 0.71) significantly predicts a decrease in lung

TABLE II. Sputum differential cell counts in patients with fixed airflow obstruction

	Patients with fixed airflow obstruction, asthma		Patients with fixed airflow obstruction, COPD	
	Baseline	End of study	Baseline	End of study
No. of cells (10^5 cells/mL)	8 (4–9)	8 (5–12)	8 (5.6–13)	7.4 (4.5–10.6)
Macrophages (%)	24 (9.5–32.7)	23.8 (10.1–31.4)	21 (16.5–26.7)	22.5 (15–36)
Neutrophils (%)	70.0 (52.2–79)	68 (65–79.4)	79 (70.5–82)*	76 (64–82.2)†
Eosinophils (%)	9.5 (2.5–15)‡	5.3 (2–6.7)§,	0.5 (0–1.9)	0 (0–2)
Lymphocytes (%)	0.5 (0–1)	0 (0–1)	0.5 (0–0.5)	0 (0–0)

Data are expressed as medians (interquartile ranges).

* $P < .05$ versus patients with fixed airflow obstruction due to asthma at baseline.

† $P < .05$ versus patients with fixed airflow obstruction due to asthma at the end of the study.

‡ $P < .01$ versus patients with fixed airflow obstruction due to COPD at baseline.

§ $P < .01$ versus patients with fixed airflow obstruction due to COPD at the end of the study.

|| $P < .05$ versus baseline.

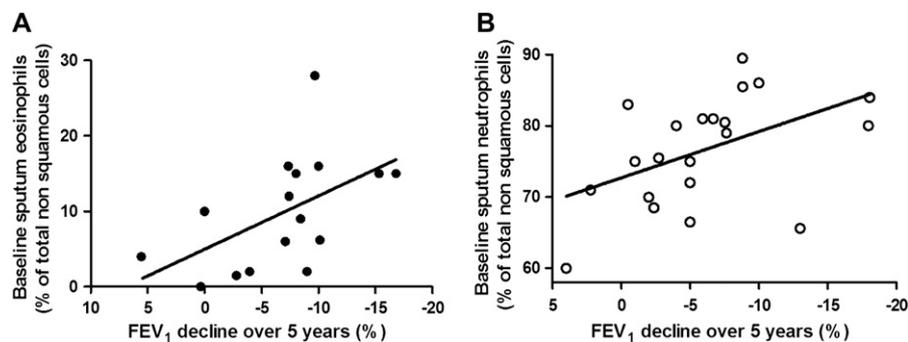


FIG 2. Correlations between rates of FEV₁ decline and markers of airway inflammation. Correlations between rates of FEV₁ decline (percent predicted) over 5 years and the percentage of sputum eosinophils at baseline in patients with fixed airflow obstruction due to asthma ($P < .05$, $r = 0.53$; **A**) and the percentage of sputum neutrophils at baseline in patients with fixed airflow obstruction due to COPD ($P < .05$, $r = 0.49$; **B**) are shown.

function greater than the median value of the group (-1.54% predicted per year), whereas in patients with COPD, a percentage of sputum neutrophils greater than 77.3% (best cutoff point with a sensitivity of 0.80 and a specificity of 0.81) significantly predicts a decrease in lung function greater than the median value of the group (-1.00% predicted per year).

Exacerbations: 5-year follow-up

During the 5-year study, a total of 361 exacerbations requiring medical intervention were recorded, of which 15 (4.15%) required hospitalization. The mean number of exacerbations per patient-year was no different between patients with fixed airflow obstruction due to asthma (1.41 ± 0.26) or COPD (1.98 ± 0.3), and it was significantly higher compared with that seen in the asthmatic patients with reversible airflow obstruction (0.53 ± 0.11 , $P < .01$). The percentage of exacerbations requiring hospitalization tended to be higher in patients with fixed airflow obstruction due to COPD compared with that seen in patients with fixed airflow obstruction due to asthma (6.2% vs 1.7% of total exacerbations, respectively; $P = .07$). None of the exacerbations occurring in asthmatic patients with reversible airflow obstruction required hospitalization.

A positive correlation was found between the percentage of sputum eosinophils at baseline and the frequency of exacerbation ($P < .01$, $r = 0.79$) in patients with fixed airflow obstruction due to asthma (Fig 3, A). By contrast, in patients with fixed airflow

obstruction due to COPD, the frequency of exacerbations was positively correlated with baseline sputum neutrophil counts ($P < .05$, $r = 0.48$; Fig 3, B). In patients with COPD, the frequency of exacerbations was also positively correlated with the FEV₁ decline rate ($P < .05$, $r = .53$) and with patients' self-reported comorbidities at baseline, as assessed by means of the Charlson Index ($P < .05$, $r = 0.47$).

The percentage of sputum eosinophils in patients with fixed airflow obstruction due to asthma and the percentage of sputum neutrophils in patients with COPD were good predictors of increased frequency of exacerbations (values of the area under the ROC curves, 0.86 and 0.84, respectively). In asthmatic patients with fixed airflow obstruction, a percentage of sputum eosinophils greater than 9.5% (best cutoff point with a sensitivity of 0.87 and a specificity of 0.87) significantly predicts increased frequency of exacerbations greater than the median value of the group (1.1 exacerbation per year), whereas in patients with COPD, a percentage of sputum neutrophils greater than 79.5% (best cutoff point with a sensitivity of 0.72 and a specificity of 0.80) predicts a frequency of exacerbation greater than the median value of the group (1.6 exacerbations per year).

Comorbidities: 5-year follow-up

At baseline, the Charlson index was significantly higher in patients with COPD (2.23 ± 0.4 , $P < .01$) than in the 2 groups of asthmatic patients (0.81 ± 0.20 and 0.73 ± 0.22 in asthmatic

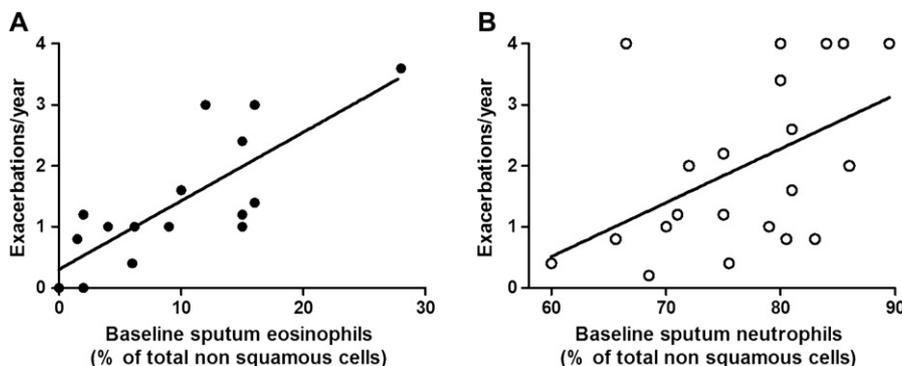


FIG 3. Correlations between exacerbation frequency and markers of airway inflammation. Correlations between the mean number of exacerbations per patient per year and the percentage of sputum eosinophils at baseline in patients with fixed airflow obstruction due to asthma ($P < .01$, $r = 0.79$; **A**) and the percentage of sputum neutrophils at baseline in patients with fixed airflow obstruction due to COPD ($P < .05$, $r = 0.48$; **B**) are shown.

subjects with and without fixed airflow obstruction, respectively). At the end of the study, the number of coexistent illnesses was higher in patients with COPD (1.95 ± 0.26 , $P < .01$) than in the 2 groups of asthmatic patients (0.85 ± 0.16 and 0.70 ± 0.16 in asthmatic subjects with and without fixed airflow obstruction, respectively). In the COPD group only, a positive correlation was found between the baseline Charlson Index and the decline in FEV₁ ($P < .001$, $r = 0.68$). Moreover, among patients with COPD, a positive correlation was found between the percentage of neutrophils in sputum at baseline and the number of comorbidities at the end of the study ($P < .05$, $r = 0.54$).

DISCUSSION

This is a 5-year follow-up study conducted in a cohort of patients previously described cross-sectionally as having fixed airflow obstruction with either a history of asthma or COPD. We found that patients with fixed airflow obstruction due to either COPD or asthma had a greater postbronchodilator FEV₁ decline compared with that seen in asthmatic patients with reversible airflow obstruction. The rate of lung function decline was similar in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or COPD. Similarly, the frequency of exacerbations was higher in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or COPD than in asthmatic subjects with reversible airflow obstruction.

Previous studies have shown that asthmatic patients have a faster decline in lung function compared with healthy subjects,^{10,30} and the excess decline that characterizes COPD has been extensively described.³¹⁻³³ However, no study has previously compared lung function decline in fully characterized patients with a clinical history of either asthma or COPD who share a similar degree of fixed airflow obstruction. This study indicates that the presence of a fixed airflow obstruction might be a key prognostic determinant. Indeed, age-matched patients with reversible airflow obstruction have a slower rate of lung function decline, which is close to previously reported values,¹⁰ whereas persistent airflow obstruction accelerated lung function decline irrespective of the underlying disease. Whether a similar accelerated lung function decline characterizes fixed airflow obstruction also in younger asthmatic patients needs to be evaluated in specific studies.

Interestingly, in a classical epidemiologic study, Burrows et al³⁴ reported that among patients with airflow obstruction,

those self-referred as “chronic asthmatic bronchitics” had a lower FEV₁ decline compared with that seen in smokers with a similar airflow obstruction and no history of asthma. There are obvious differences between the Burrows et al study and the present study (eg, self-reported diagnosis vs careful clinical characterization; the enrollment diagnostic criteria of “chronic asthmatic bronchitis” vs asthma with fixed airflow obstruction persisting after bronchodilators and a short course of systemic corticosteroids) that might explain the discrepancies.

Extensive characterization of our population at baseline¹¹ allowed us to recognize that the development of fixed airflow limitation in asthmatic patients modifies the rate of lung function decline, which becomes similar to that of COPD. However, in patients with fixed airflow obstruction due to asthma, but not in patients with fixed airflow obstruction due to COPD, there is a direct relationship between the rate of decline and some of the markers of the airway inflammation typical of asthma, such as sputum eosinophil counts and eNO levels. By contrast, only in patients with COPD are some features of the disease (eg, increased sputum neutrophil counts and emphysema scores and impaired diffusion capacity) related to the lung function decline rate. Thus when fixed airflow obstruction is present, the accelerated lung function decline is associated with specific characteristics of the underlying disease. Notably, none of these relationships could be identified when we considered the population of patients with fixed airflow obstruction as a whole. This observation is particularly relevant in the design and interpretation of epidemiologic studies because important clinical outcomes could be missed when relying on spirometric patterns only for patient selection in the absence of an accurate clinical history.

In previous studies it has been reported that bronchodilator reversibility is a potential predictor of accelerated FEV₁ decline in patients with asthma.^{8,35} Here we found an inverse relationship: the higher the reversibility to bronchodilator, the lower the rate of decline. Our report evaluated only asthmatic patients with fixed airflow obstruction, which might be responsible for the difference with previous studies, further emphasizing the concept that it is the presence of irreversible airflow obstruction that influences the rate of decline in this population.

In our study residual volume significantly increased only in patients with COPD. In addition, the decrease of K_{CO} over 5 years was significantly higher in patients with COPD than that observed

in asthmatic patients with fixed airflow obstruction. These data, together with the observations that emphysema score and K_{CO} impairment positively correlated with lung function decline only in patients with COPD, suggest that parenchymal destruction is not just an aspect of COPD pathogenesis but also contributes to COPD progression, whereas it has only marginal relevance in the pathogenesis and progression of asthma, even in the presence of fixed airflow obstruction.

There is evidence in patients with COPD that airway neutrophilia progressively increases with worsening of pulmonary function.^{36,37} Intriguingly, in our study the percentage of sputum neutrophils in patients with COPD was also related to the number of exacerbations, and in line with recent studies,³⁸ we found that the higher the exacerbation rate, the faster the decline in FEV₁. Taken together, these observations suggest that there is a close interplay between exacerbations, neutrophil counts, and lung function decline in patients with COPD: patients experiencing frequent exacerbations have repeated bursts of airway neutrophilia and are more prone to a rapid decline in lung function. Conversely, in patients with fixed airflow obstruction due to asthma, we found a positive correlation between sputum eosinophil counts at baseline and the frequency of exacerbation. We also found that sputum inflammatory cell counts (eosinophils in patients with asthma and neutrophils in patients with COPD) could have predictive value on exacerbation rate and lung function decline. However, given the limited number of patients included in our cohort, these data need to be confirmed in a larger population. The persistence of eosinophilic inflammation despite regular inhaled corticosteroid treatment suggests that asthmatic patients with fixed airflow obstruction are refractory to inhaled corticosteroid treatment. Such a poor response leads to persistent inflammation, which in turn might contribute to the acceleration in lung function decline in asthmatic subjects with fixed airflow obstruction.⁹ It is also possible that fixed airflow obstruction develops in steroid-refractory patients through uncontrolled airway inflammation leading to structural changes and persistent airflow limitation. Moreover, in line with our observation, a recent study showed that eNO levels could predict lung function decline in patients with clinical difficult-to-treat asthma.³⁹ Contrary to recent studies in patients with mild-to-moderate asthma,^{40,41} we found no relationships between exacerbation frequency and lung function decline in our asthmatic patients. This might be due to differences in the populations but also to the limited number of patients considered in our explorative study. Our study has only begun to fulfill a relevant medical need in respiratory medicine: the lack of information on a relevant proportion of the asthmatic population that has been neglected from clinical investigations. This is the first report of a cohort of well-characterized patients with fixed airflow obstructions due to asthma or COPD in which a 5-year follow-up has been performed. The careful characterization of the original cohort of patients,¹¹ which we followed over 5 years, is one of the major strengths of the study, which allowed us to unmask the importance of fixed airflow obstruction in a prognostic perspective that goes beyond the horizon of COPD.

Compared with age-matched healthy subjects, patients with COPD are more frequently affected by comorbidities^{42,43} that contribute to morbidity severity and mortality.^{27,44} We found that patients with COPD have a higher prevalence of comorbid conditions than age-matched asthmatic subjects, even when they share a similar fixed airflow obstruction. The higher prevalence of chronic

comorbid conditions in patients with COPD could be related to the smoking habits of these subjects.⁴⁵

In conclusion, this study shows that patients with fixed airflow obstruction caused by either asthma or COPD have an accelerated lung function decline and an increased frequency of exacerbations compared with those seen in asthmatic patients fully reversible to bronchodilator. However, in subjects with fixed airflow obstruction, both lung function impairment and exacerbation frequency are associated with pathogenetic substrates, which are specific for the underlying disease (asthma vs COPD). Therapeutic strategies should be addressed to different cellular targets, pathogenetic aspects, or both in the 2 diseases.

Clinical implications: Fixed airflow obstruction leads to increased lung function decline and frequency of severe exacerbations in both patients with asthma and those with COPD. Distinctive clinical and inflammatory markers predict the degree of lung function decline.

REFERENCES

- Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. NHLBI/WHO workshop report. 2002. Bethesda: National Institutes of Health; 2008. NIH publication no. 02-3659.
- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). National Institute of Health; National Heart Lung, and Blood Institute. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Workshop report. Bethesda: National Institutes of Health; 2008. NIH publication no. 2701A 2001.
- Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008;38:872-97.
- Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000;343:269-80.
- Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1304-9.
- ten Brinke A. Risk factors associated with irreversible airflow limitation in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:63-9.
- Mannino DM, Gagnon RC, Petty TL, Lydick E. Obstructive lung disease and low lung function in adults in the United States: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 2000;160:1683-9.
- Ulrik CS, Backer V. Nonreversible airflow obstruction in life-long nonsmokers with moderate to severe asthma. *Eur Respir J* 1999;14:892-6.
- ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:744-8.
- Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen GA. 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 1998;339:1194-200.
- Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, Casoni G, Busljetic K, Turato G, et al. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:418-24.
- Gibson PG, Simpson JL. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it? *Thorax* 2009;64:728-35.
- Papi A, Romagnoli M, Baraldo S, Braccioni F, Guzzinati I, Saetta M, et al. Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1773-7.
- Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, et al. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Eur Respir J Suppl* 2002;suppl:3 7:19s-23.
- Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, et al. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:309-29.
- European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. *Eur Respir J* 2003;22:470-7.
- Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 1987;40:373-83.

18. Bousquet J, Boulet LP, Peters MJ, Magnussen H, Quirarte J, Martinez-Aguilar NE, et al. Budesonide/formoterol for maintenance and relief in uncontrolled asthma vs. high-dose salmeterol/fluticasone. *Respir Med* 2007;101:2437-46.
19. Busse WW, Pedersen S, Pauwels RA, Tan WC, Chen YZ, Lamm CJ, et al. The Inhaled Steroid Treatment As Regular Therapy in Early Asthma (START) study 5-year follow-up: effectiveness of early intervention with budesonide in mild persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1167-74.
20. Rabe KF, Atienza T, Magyar P, Larsson P, Jorup C, Laloo UG. Effect of budesonide in combination with formoterol for reliever therapy in asthma exacerbations: a randomised controlled, double-blind study. *Lancet* 2006;368:744-53.
21. Calverley PM, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martinez FJ. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009;374:685-94.
22. Wedzicha JA, Calverley PM, Seemungal TA, Hagan G, Ansari Z, Stockley RA. The prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations by salmeterol/fluticasone propionate or tiotropium bromide. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:19-26.
23. Welte T, Miravitlles M, Hernandez P, Eriksson G, Peterson S, Polanowski T, et al. Efficacy and tolerability of budesonide/formoterol added to tiotropium in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:741-50.
24. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, et al. General considerations for lung function testing. *Eur Respir J* 2005;26:153-61.
25. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319-38.
26. Marti S, Munoz X, Rios J, Morell F, Ferrer J. Body weight and comorbidity predict mortality in COPD patients treated with oxygen therapy. *Eur Respir J* 2006;27:689-96.
27. Crisafulli E, Costi S, Luppi F, Cirelli G, Cilione C, Coletti O, et al. Role of comorbidities in a cohort of patients with COPD undergoing pulmonary rehabilitation. *Thorax* 2008;63:487-92.
28. Paganin F, S neterre E, Chanez P, Daur s JP, Bruel JM, Michel FB, et al. Computed tomography of the lungs in asthma: influence of disease severity and aetiology. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:110-4.
29. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982;143:29-36.
30. James AL, Palmer LJ, Kicic E, Maxwell PS, Lagan SE, Ryan GF, et al. Decline in lung function in the Besselton health study. The effects of asthma and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:109-14.
31. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007;356:775-89.
32. Celli BR, Thomas NE, Anderson JA, Ferguson GT, Jenkins CR, Jones PW, et al. Effect of pharmacotherapy on rate of decline of lung function in chronic obstructive pulmonary disease: results from the TORCH study. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:332-8.
33. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, et al. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008;359:1543-54.
34. Burrows B, Bloom JW, Traver GA, Cline MG. The course and prognosis of different forms of chronic airways obstruction in a sample from the general population. *N Engl J Med* 1987;317:1309-14.
35. Rasmussen F, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Greene JM, Herbison GP, et al. Risk factors for airway remodeling in asthma manifested by a low postbronchodilator FEV1/vital capacity ratio: a longitudinal population study from childhood to adulthood. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1480-8.
36. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1277-85.
37. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, et al. Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax* 2004;59:837-42.
38. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002;57:847-52.
39. van Veen IH, Ten Brinke A, Sterk PJ, Sont JK, Gauw SA, Rabe KF, et al. Exhaled nitric oxide predicts lung function decline in difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J* 2008;32:344-9.
40. Bai TR, Vonk JM, Postma DS, Boezen HM. Severe exacerbations predict excess lung function decline in asthma. *Eur Respir J* 2007;30:452-6.
41. O'Byrne PM, Pedersen S, Lamm CJ, Tan WC, Busse WW. Severe exacerbations and decline in lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:19-24.
42. van Manen JG, Bindels PJ, Cj Ij van der Zee JS, Bottema BJ, Schade E. Prevalence of comorbidity in patients with a chronic airway obstruction and controls over the age of 40. *J Clin Epidemiol* 2001;54:287-93.
43. Mapel DW, Hurley JS, Frost FJ, Petersen HV, Picchi MA, Coultas DB. Health care utilization in chronic obstructive pulmonary disease. A case-control study in a health maintenance organization. *Arch Intern Med* 2000;160:2653-8.
44. Fabbri LM, Rabe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *Lancet* 2007;370:797-9.
45. Mucha L, Stephenson J, Morandi N, Dirani R. Meta-analysis of disease risk associated with smoking, by gender and intensity of smoking. *Gend Med* 2006;3:279-91.

Viral infections in exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease

M. CONTOLI, B. MARKU, V. CONTI, S. SATURNI, G. CARAMORI, A. PAPI

Respiratory viral infections are recognized as the most frequent cause of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exacerbations with rhinovirus (i.e. the virus of the common cold) being the most frequent identified virus. The recent development of human experimental models of rhinovirus-induced asthma and COPD exacerbations represent innovative tools with the potential to increase our understanding in this field. Moreover this models will provide the opportunity to test, in a carefully controlled setting, novel pharmacological compounds. In this review we will provide an overview of the role of viral infections in asthma and COPD exacerbations and in particular we will summarize the inflammatory and immunological mechanisms that can pave the way to exacerbation following respiratory viral infection in these patients.

Key words: Virus diseases - Asthma - Pulmonary disease, chronic obstructive pulmonary disease.

Asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are chronic inflammatory airway diseases with high prevalence worldwide. The natural history of the two diseases is punctuated by recurrent episodes of worsening of symptoms and lung function named exacerbations, that contribute to impaired quality of life, increased morbidity and mortality of both asthma and COPD patients. Thus, the prevention of these

episodes is one of the major task of the management and the treatment of asthma and COPD.^{1, 2}

Nowadays, respiratory viral infections are recognized as the most frequent cause of asthma and COPD exacerbations with rhinovirus (i.e. the virus of the common cold) being the most frequent identified virus. Therefore, since asthma and COPD exacerbations still occur despite optimised therapy, the understanding of the inflammatory and immunological mechanisms that lead asthmatic and COPD patients to exacerbate following a respiratory viral infection is essential to highlight novel potential pharmacological targets with the potential for treating and preventing asthma and COPD exacerbations. The recent development of human experimental models of rhinovirus-induced asthma and COPD exacerbations represent innovative tools with the potential to increase our understanding in this field. Moreover this models will provide the opportunity to test, in a carefully controlled setting, novel pharmacological compounds.^{3, 4}

In this review we will provide an overview of the role of viral infections in asthma and

*Department of Clinical and Experimental Medicine
Research Centre on Asthma and COPD
University of Ferrara, Ferrara, Italy*

Corresponding author: Prof. A. Papi, University of Ferrara, Via Savonarola 9, 44121 Ferrara, Italy. E-mail: ppa@unife.it

COPD exacerbations and in particular we will summarize the inflammatory and immunological mechanisms that can pave the way to exacerbation following respiratory viral infection in these patients.

Virus infection in asthma exacerbations

Acute exacerbations are the major cause of morbidity in asthma and despite optimized currently available therapy for asthma, exacerbations still occur.

For many years general opinion has been that upper respiratory viruses were the cause of the common cold, but were able to produce serious complications only in infants, elderly and immunocompromised subjects. The use of molecular biology techniques to identify viruses in biological samples, provided sensitive and reliable tools to evaluate the role of viruses in respiratory diseases. From 1995, by RT-PCR, we know that up to 80% of episodes of wheezing in school-aged children were associated to respiratory virus infections.⁵ Several studies have confirmed the association between respiratory virus infections and asthma exacerbations in children, also in severe episodes that require hospitalisation. In adults, the association between asthma exacerbations and respiratory virus infection has been documented in 60-75% of these episodes. Notably, most of the respiratory viruses have been detected in biological samples only during exacerbations and not in stable conditions, further suggesting their role in triggering the acute episodes. Among respiratory viruses, rhinovirus (RV) is the most frequently identified in all clinical settings.⁶ In fact recent data documents that asthmatic patients are more susceptible to respiratory viral infections. Indeed, although asthmatic subjects do not appear to have increased risk of upper respiratory tract viral infections, they suffer for more severe lower respiratory tract symptoms once infected.⁷ Moreover, it has been documented that viral infections synergistically interact with allergens in increasing the risk for hospital

admission due to asthma exacerbations in atopic asthmatics.^{8,9}

Mechanisms of virus induced asthma exacerbations

The precise mechanisms by which respiratory viruses, and particularly rhinoviruses, may induce an asthmatic exacerbation are still unknown. Experimental models both *in vitro* and *in vivo* have shown that respiratory virus infections of asthmatic subjects may reproduce many of the pathological and clinical features of asthma exacerbations including release of proinflammatory mediators, increased bronchial hyperresponsiveness and worsening of asthma symptoms.⁶

Experimental rhinovirus infection of asthmatics leads to an increase in lower respiratory tract symptoms typical of a mild asthma exacerbation.

By detailed monitoring, it has been possible to detect, during the acute phase of experimental rhinovirus infection, reductions in both peak expiratory flow (PEF)¹⁰ and FEV₁¹¹ in atopic asthmatic patients.

Recently, it has been documented that experimental rhinovirus infection in asthmatic patients results in greater chest symptoms and changes in lung function than in normal subjects. Moreover, viral load in bronchoalveolar lavage (BAL) directly correlates with the severity of symptoms and disturbance of lung function supporting the causative role of rhinovirus in the induction of asthma exacerbation.¹²

Since the early nineteen's it is known that experimental rhinovirus infection increases bronchial responsiveness to many stimuli and the severity of both early and late asthmatic responses post-allergen challenge.¹³ Increased bronchial responsiveness (AHR) usually begins early after rhinovirus infection both in asthmatic and in non-asthmatic atopic subjects. There is persistence of post-viral AHR for around 7 weeks in asthmatic children, comparable to that is observed in experimental animal models.^{14, 15} Although the duration of AHR after a single cold is not affected by the atopic status of the patient, symptomatic

colds may cumulatively lead to prolonged AHR in atopic children.¹⁵ Prolongation of virus-induced AHR may reflect persistent airway inflammation after multiple viral insults.

Among the possible causes of viral induced enhancement of AHR, the release of pro-inflammatory mediators, the epithelial damage and an imbalance between bronchodilating/bronchoconstricting NANC mediators, have been studied. Both animal and *in vitro* studies suggest that viral infections could stimulate sensory nerves, reflex parasympathetic bronchoconstriction and/or interfering with the function of nonadrenergic, noncholinergic (NANC) nerves, which produce bronchodilator mediators such as nitric oxide (NO), vasoactive intestinal peptide (VIP) and bronchoconstrictor mediators such as tachykinins (substance P and neurokinins).¹³ Virus-mediated damage to the epithelial layer can expose the dense subepithelial network of unmyelinated afferent sensory fibres, which may increase stimulation of sensory nerves by inhaled particles or pro-inflammatory mediators. Sensory nerves can directly release neuropeptides, such as tachykinins, that induce contraction of smooth muscle cells, or can trigger reflex bronchoconstriction by activating parasympathetic bronchoconstrictor nerves. This reflex causes release of acetylcholine (ACh) and contraction of airway smooth muscle cells *via* stimulation of muscarinic M3 receptors. Normally, ACh inhibits its release through the activation of muscarinic M2 receptors localised on the pre-synaptic terminals of the postganglionic parasympathetic (cholinergic) nerves, acting as a physiologic auto-inhibitory feedback to prevent an excessive degree of bronchoconstriction.

In animal models, respiratory viruses, directly and through the release of inflammatory mediators, such as the major basic protein (MBP) released from the eosinophils, can decrease the expression and/or the function of M2 ACh receptors and block this auto-inhibitory feedback, thus enhancing ACh release from cholinergic nerves and potentiating reflex parasympathetic bronchoconstriction.¹³

Respiratory viruses enter into and replicate within epithelial cells lining the upper and

lower airways and the extent of epithelial cell damage observed in the airways varies according to virus type. The minimal epithelial damage seen in RV infection has led to the concept that clinical manifestations are linked to immune-mediated mechanisms, with pro-inflammatory mediators and inflammatory cells producing pathology, rather than to a direct cytotoxic effect of the virus. The respiratory epithelium has important regulatory roles and contributes to the immune response following virus infection through the production of inflammatory mediators, cytokines and chemokines. Interleukin (IL)-8¹⁶ and IL-6¹⁷ have been detected in increased amounts in nasal samples during virus infections in asthmatics. IL-11 is present in nasal aspirates from children with upper respiratory infection and levels correlate with clinically detectable wheezing¹⁸. Inflammatory mediators have been reported in the lower respiratory tract in virus-induced exacerbations. Increases in IL-6, IL-8 and eosinophil cationic protein (ECP) have been documented in sputum in asthmatics after experimental rhinovirus infection.¹⁹

The adhesion molecule ICAM-1 may play a particular role as a pathogenetic link between virus infections and asthma exacerbations because it represents the receptor utilised by 85-90% of RV serotypes for binding to human cells.²⁰ Both *in vivo* and *in vitro*, RV infection of airway epithelial cells upregulates expression of ICAM-1.^{21, 22} Through this mechanism RVs are able to increase the expression of their own receptor on the epithelial surface, enhance viral attachment and entry into the host cell.

ICAM-1 is also involved in the pathogenesis of allergic inflammation. After exposure to allergen there is an increased expression of ICAM-1 on the surface of the epithelial cells at the sites of allergic inflammation where, together with other adhesion molecules and chemokines, it promotes the recruitment and infiltration of leukocytes. The Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-13, associated with allergic inflammation enhance ICAM-1 expression on epithelial cells and therefore allergic inflammation and thus by enhancing ICAM-1 expression on airway epithelial cells, may facilitate

rhinovirus infection in atopic subjects. Conversely, RV infections by increasing the expression of ICAM-1 may facilitate leukocyte infiltration in the lower airways contributing to the development of asthma exacerbations.

There are few studies assessing the cellular response to viral infections in the lower airways in asthmatics.

After experimental human RV infection there is an increased numbers of neutrophils in BAL,²³ but not in sputum.²⁴

During experimental cold induced by RV infection, in bronchial biopsies there is an increased number of T-lymphocytes and eosinophils but without significant differences between asthmatics and control subjects.²⁵

Intriguingly, at 6 weeks postinfection the eosinophilia persists in the asthmatics but has resolved in the normal controls indicating a persistent inflammation in asthmatic that may be the result of an impaired viral clearance.²⁵ Preliminary data so far published only in abstract form, show an increased inflammatory cell infiltration in the lower airways of asthmatic patients as compared to normal controls following *in vivo* experimental rhinovirus infection.²⁶

Further studies are required to elucidate the mechanisms that lead asthmatic patients to exacerbate once they are infected. In particular it is crucial to evaluate whether asthmatic patients have a different behaviour in term of inflammatory and/or immunological response as compared to normal subjects in response to respiratory viral infections. The use of *in vivo* human models of virus induced asthma exacerbation represent an invaluable tool in this field.

The understanding of the inflammatory and immunological mechanisms involved in virus induced asthma exacerbations will offer the opportunity to identify novel potential pharmacological targets able to treat and/or prevent viral induced asthma exacerbations.

Susceptibility to virus infections in asthmatic patients

Recent studies indicate that asthmatic patients are more susceptible to naturally

occurring rhinovirus infection than normal individuals. Indeed lower respiratory tract symptoms and changes in PEF are both more severe and of longer duration in the asthmatics than in the normal subjects following respiratory tract viral infection.⁷

However, the reasons for this increased susceptibility of asthmatics is largely unknown.

An emerging hypothesis supported by *in vitro* and *in vivo* experimental models proposes that asthmatic patients have a defect in the innate and acquired antiviral defences against respiratory virus infections.

Physiologically to achieve an adequate viral clearance from the airways, both an efficient innate and Th1-orientated acquired (adaptive) immune response are required. *In vitro*²⁷ and *in vivo*²⁸ data indicate that rhinovirus infection of asthmatic patients triggers an impaired Th1 and an inappropriate Th2-orientated immune response that may lead to an inefficient viral clearance and to an enhancement of the pre-existing Th2 inflammatory response.

Moreover, a deficiency in the innate immune arm has also been recently documented in asthmatic patients following rhinovirus infection. This deficiency leads to an increased rhinovirus replication and virulence in the lower airways of asthmatic patients. In particular, *ex vivo* rhinovirus infection of bronchial epithelial and bronchoalveolar lavage (BAL) cells from asthmatics results in an impaired production of antiviral interferons (IFNs) (IFN- β and IFN- γ) as compared to normal controls.^{29, 30} Intriguingly, *ex vivo* IFN- γ production was inversely related to viral load in BAL, airway inflammation and severity of asthma exacerbation *in vivo* experimentally induced by rhinovirus infection.²⁹

On the innate immune side not only antiviral but also antibacterial responses may be impaired in asthmatic patients. A recent study documented that asthma is a risk factor for invasive pneumococcal disease indicating an increased risk of bacterial infections in asthma,³¹ while other studies indicate increased detection of *Chlamydoiphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in the lower air-

ways of asthmatic patients during stable phase and/or exacerbations.^{32, 33}

The mechanisms of increased susceptibility to bacterial infections in asthma are unknown. However, it is likely that innate IFNs production is also important in host defence against both Gram-negative and Gram-positive (including *Streptococcus pneumoniae*) bacterial infections,³⁴⁻⁴¹ though their potential defensive role is still much less investigated than viral respiratory infections.⁴²

Interestingly, it has been documented that IFN- λ production, in response to bacterial lipopolisaccharide (LPS) stimulation of BAL cells, is markedly reduced in asthmatics as compared to normal subjects and is inversely related to the level of fall in forced expiratory volume in one second (FEV₁) after *in vivo* rhinovirus infection.²⁹

Taken together these studies²⁹⁻³¹ indicate that the deficiencies in components of innate immune responses in asthmatic subjects are surprisingly broad and involve defective responses against both viruses and bacterial components (LPS) in two major interferon families (IFN- β and IFN γ).

The mechanisms behind such a deficiency are still unknown. It is not known whether impaired immune response is an intrinsic genetically determinate characteristic of asthmatic patients, whether it is the result of an inadequate maturation of innate responses to reduced exposure to infections in early life (which is thought to be involved in the increasing prevalence of asthma) or whether is the effect of a pre-existing Th2 inflammatory environment which is potentially able to inhibit innate immune responses. To support the latter hypothesis, a deficient Th1 and an excessive Th2 cytokine production in BAL of asthmatic patients experimentally infected with rhinovirus has been recently described and related to increased viral load and chest symptoms in asthmatic subjects:²⁶ the higher is the Th2 immune response to rhinovirus infection, the lower is the Th1 immune response and the more severe is the virulence of the RV infection in asthmatic patients.

***In vivo* models of viral induced asthma exacerbation**

Rhinoviruses can infect the lower airways.⁴³ *In vivo* experimental infection studies documented that rhinovirus infection leads to long lasting airway narrowing,⁴⁴ reduction in lung function in asthmatic volunteers¹⁰ and to increased bronchial hyperreactivity not only in asthmatic subjects but also in allergic non-asthmatic subjects.⁴⁵ Recently, a human model of experimental rhinovirus infection in healthy subjects and in asthmatic patients, exploring clinical, functional and inflammatory response, has been set up.⁴ This model clearly documented that the same amount of virus lead to different clinical responses in healthy and asthmatic subjects.

Indeed, experimental rhinovirus infection causes symptoms limited only to the upper airways (common cold) in healthy subjects whereas it causes cough, sputum and dyspnoea (*i.e.* lower airway symptoms) in asthmatic patients.

Moreover experimental rhinovirus infection leads to worsening of lung function and increased bronchial hyperresponsiveness only in asthmatic patients without any effect on lung function parameters in healthy subjects.

Such a more severe clinical and functional response in asthmatic patients is associated to an increased viral load in the airways of asthmatic patients and to a different inflammatory response. Indeed in asthmatic patients an aberrant Th2-orientad inflammatory response occurs in the airways following experimental rhinovirus infection, by contrast a predominant Th1-oriented (*i.e.* the natural antiviral immune response) occurs in healthy subjects.⁴

These data experimentally documented and confirmed the old clinical observation that asthmatic patients are indeed more susceptible to respiratory viral infection.⁷ Such an increased susceptibility can be related to an inefficient Th1-antiviral immune response and to a relative increased Th2-orientated immune response that can further exacerbate the pre-existing inflammation of the airways of asthmatic patients.

Virus infection in COPD exacerbations

The clinical history of COPD is punctuated by recurrent episodes of increases in dyspnoea, cough or sputum production sufficient to warrant a change in management. These events are named exacerbations and are a common occurrence in many COPD patients. The frequency of COPD exacerbations increases with increased severity of the disease.⁴⁶⁻⁴⁸ In addition to increasing COPD associated morbidity and mortality, exacerbations contribute to loss of lung function and impaired health status in COPD patients.⁴⁹⁻⁵² Thus treatment and prevention of COPD exacerbations are fundamental to the management of COPD. Nevertheless the available pharmacological treatment for COPD is only partially effective in preventing COPD exacerbations.

Although it often has been assumed that exacerbations are associated with increased airway inflammation, there is little information on the nature of the acute-on-chronic inflammation that characterises these episodes. Most of the data currently available refer to soluble indirect markers of airway inflammation rather than inflammatory cell infiltration *per se*. Indeed, it is difficult to perform bronchial biopsies during an exacerbation in patients with moderate to severe COPD.

Infection of the tracheobronchial tree, together with air pollution, are the most common causes of COPD exacerbations. Thus the understanding of the pathophysiological and inflammatory mechanisms that lead to an exacerbation following respiratory tract infection will give the opportunity to identify novel pharmacological target able to treat and prevent COPD exacerbations.

The use of highly sensitive diagnostic methods such as polymerase chain reaction (PCR) to evaluate the association between respiratory virus infections and COPD exacerbations has demonstrated that these viruses are responsible for a much higher proportion of exacerbations than was previously realised.

In a study of the East London COPD cohort, PCR was used to detect rhinovirus in nasal and sputum samples from COPD patients during an exacerbation and when clinically sta-

ble;⁵³ 23% of exacerbation samples were positive for rhinovirus compared to 0% when clinically stable. These data clearly indicate that, at variance with bacteria in which a chronic colonisation can be present also in the stable state, rhinoviral infection is important in inducing exacerbation. In a further study virus was detected in 39% of exacerbations, the most common being rhinoviruses that accounted for 58% of viruses.⁵⁴

A higher virus detection rate has also been reported in hospitalised patients. A respiratory virus was detected in around 50% of patients with severe COPD exacerbation admitted to hospitals in Germany and in Italy, with rhinovirus again being the most common.^{55, 56} In patients with COPD requiring intubation and mechanical ventilation virus was identified in 47% of patients.⁵⁷ Together, these data indicate that respiratory virus infection is associated with a substantial proportion of COPD exacerbations, with rhinovirus the most frequently identify virus.

A recent study has addressed the relative importance of viral versus bacterial infections, to the aetiology of severe (hospitalised) COPD exacerbations. Viral and/or bacterial infection was detected in 78% of COPD exacerbations, with viruses in 48.4% (6.2% when stable), bacteria in 54.7% (37.5% when stable). Patients with exacerbations of infectious etiology required longer hospitalisations and demonstrated a greater impairment of several measures of lung function than patients with non-infectious exacerbations. Moreover, the most severe exacerbations were those in which viral and bacterial co-infection was detected.⁵⁶ Similar results also have been found in studies of COPD exacerbations in outpatients.⁵⁸ Indeed patients, in which both bacterial and viral pathogens were detected, had increased inflammatory markers in sputum and greater lung function fall as compared to patients in which a single pathogen was detected. However, the relationship between viral and bacterial infection, especially when combined, needs to be further studied. In particular it needs to be established whether viral infection can pave the way for exacerbation by bacteria colonizing the lower respiratory tract of COPD patients.

Mechanisms of virus induced COPD exacerbations

At variance with asthma in which several *in vitro* and *in vivo* studies have investigated the mechanisms that lead to exacerbation after viral infection of the airways,^{6, 59} very few data are available for COPD.

During COPD exacerbations several inflammatory mediators are increased in the airways over baseline levels. Moreover COPD patients with more frequent exacerbations have higher sputum levels of inflammatory markers interleukin (IL)-6 and IL-8 even when stable,⁶⁰ suggesting that there may be a pro-inflammatory effect of COPD exacerbations that persists after the acute episode has resolved. Little is known about the inflammatory mediators specific to virus-induced COPD exacerbations. One study has found an increased sputum level of IL-6 in viral associated acute episodes as compared to non viral exacerbations.⁵³ Recently the simultaneous presence of both rhinovirus and *Haemophilus influenzae* at exacerbations has been associated with an increased level of serum IL-6 suggesting that viruses and bacteria can synergistically interact to increase the severity of the inflammation.⁵⁸

There is evidence for up regulation of ICAM-1 in the bronchial mucosa of patients with chronic bronchitis.⁶² Upregulation of ICAM-1 may increase infectivity and lead to an augmented inflammatory response.

The type of inflammatory cells recruited to the lung during COPD exacerbations has not been fully clarified. Very few studies have analyzed bronchial biopsies at exacerbations due to the difficulties of carrying out an invasive procedure in acutely ill patients. Two studies using bronchial biopsies during exacerbations of chronic bronchitis from a single cohort of patients reported a prominent airway eosinophilia at exacerbation together with an increased number of neutrophils and T-lymphocytes in the exacerbated group compared to the stable patients.^{63, 64} A recent study has shown an increased number of neutrophils in sputum during exacerbations and the increase was independent from the type (bacteria or virus) of infectious agent

detected. The same study documented that virus induced COPD exacerbations with or without concomitant bacterial infection are associated with an increased number of sputum eosinophils, suggesting that sputum eosinophilia could be a marker of viral infection during COPD exacerbations.⁵⁶

Interestingly, increased sputum CD8+ T lymphocytes have been reported during COPD exacerbations with a relative reduction in the ratio of interferon (IFN)- γ /IL-4 expressing CD8+ T lymphocytes.⁶⁵ Thus, a switch towards a T helper (Th)2-like immunophenotype during COPD exacerbations could trigger recruitment of eosinophils, a classical effector cell recruited during Th2 mediated immune responses, during virus induced COPD exacerbations.

COPD is associated with increased oxidative stress and that is believed to play a central role in the disease pathogenesis. Oxidants could represent a key intracellular mediator of virus-induced cellular activation. Interestingly, oxidative stress can induce activation of the pro-inflammatory transcription factors nuclear factor (NF)- κ B and activator protein (AP)-1 two pivotal regulators of the inflammatory processes. NF- κ B is activated in sputum macrophages during COPD exacerbations.⁶⁶ Rhinovirus infection induces increased production of superoxide anion in bronchial epithelial cells and this event is a crucial step for the activation of NF- κ B and the following production of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules.⁶⁷ Reducing agents inhibit both rhinovirus-induced oxidant generation and inflammatory mediator production and release. These data suggest that the inhibition of intracellular oxidative stress and/or of NF- κ B activation may be a potential therapeutic target for treatment of virus induced COPD exacerbations.⁶⁸

Susceptibility to virus infections in COPD patients

Whether COPD patients are more susceptible to virus infection as compared to normal subjects is still debated. A recent study doc-

umented that patients with frequent COPD exacerbations have more frequent episodes of naturally occurring colds as compared to patients with infrequent exacerbations.⁶⁹ These results suggest that COPD subjects with frequent exacerbations may represent a subgroup particularly susceptible to viral infections, but they do not determine whether this susceptibility relates to the general COPD population. Thus, while there is solid evidence of impaired innate^{29,30} and possibly acquired^{27,28} immune responses to viral infection in asthmatic patients it is not yet clear whether COPD patients have increased susceptibility to viral infections. Intriguingly patients experiencing frequent colds had a significantly higher exposure to cigarette smoke.⁶⁹ Recently, using a mouse model of cigarette smoke exposure, it has been demonstrated that cigarette smoke increases susceptibility to viral infections possibly via alteration/inhibition of immune response.⁷⁰

Another possible mechanism leading to increased susceptibility is related to up regulation of ICAM-1, the receptor for the major group of human rhinoviruses. Latent expression of adenoviral E1A protein in alveolar epithelial cells of patients with emphysema increases ICAM-1 expression and this could be a potential mechanism for greater susceptibility to rhinovirus infection in COPD patients where has been described, albeit still controversial, an increased colonization of their lower airways epithelium by the adenovirus.⁷¹

Solid evidence shows that the lower airways of the COPD patients are chronically colonized with bacteria, and the airway bacterial load is related to the intensity of airway inflammation and the rapidity of disease progression.⁷²

It has been postulated that bacterial colonization could contribute to increased susceptibility to viral infection in COPD patients for example by increasing ICAM-1 expression in bronchial epithelial cells either directly or through induced inflammation.⁷³

Further studies are required to investigate the interaction between chronic bacterial colonisation and respiratory viral infection and in particular whether chronic bacterial

colonisation can increase susceptibility to viral infection or *vice versa*.

***In vivo* models of viral induced COPD exacerbation**

In vitro data document that respiratory virus infection can lead to COPD exacerbation via the production of several pro-inflammatory mediators that are relevant to the pathogenesis of COPD exacerbation.^{61,74-76} However, although *in vitro* models can provide important insights into the molecular mechanisms of inflammatory and immune responses to viral and bacterial infections, the *in vitro* data require validation using *in vivo* models.

Bacterial infections have been considered important causes of COPD exacerbations for a long time. Nevertheless, while several mechanisms (*e.g.* induction of mucus hypersecretion,⁷⁷ reduction of ciliary beat frequency⁷⁸ and enhancement of neutrophilic inflammation⁷⁹) have been proposed to explain how bacterial infection can trigger COPD exacerbations, no animal model of bacteria induced COPD exacerbation is available. Until recently this was also true for viral exacerbations.

Carrying out studies of naturally occurring COPD exacerbations has proved difficult for a number of reasons including: non reporting of exacerbations by patients, lack of baseline data before exacerbations, wide variation in aetiology, variation in timing of sampling relative to onset of exacerbation and finally carrying out invasive airway investigations in acutely unwell patients is difficult and may jeopardize their health. One way to overcome these obstacles is the development of a human experimental model that would allow studies to take place under controlled conditions. The first step towards development of such a model has been recently realized³ with the reporting of the first study evaluating the effects of an experimental rhinovirus infection in COPD patients.

In this pilot study mild COPD patients were selected for experimental infection with the purpose of providing preliminary data on

whether experimental rhinovirus infection in COPD patients is *per se* sufficient to trigger an exacerbation. All of the first four patients exposed to the initial lowest dose of rhinovirus inoculum experienced not only cold symptoms but also lower respiratory tract symptoms characteristic of a COPD exacerbation associated with a significant fall in lung function³ as occurs with naturally occurring exacerbations.⁸⁰ Thus, this model showed that experimental rhinovirus infection can cause exacerbation in COPD patients and that this model has the potential to provide a valid model of naturally occurring COPD exacerbation. In COPD this is so far the only scenario in which a specific aetiology has been experimentally proven to induce exacerbation.

Two potentially important preliminary observations arose from this study: 1) COPD patients developed colds and exacerbations with 100- to 1 000-fold lower doses of virus than used in previous studies in asthmatic and normal volunteers; 2) there was a 3 to 4 days gap between the peak of cold symptoms and the peak of lower respiratory symptoms.³ These data suggest that COPD patients may be highly susceptible to virus infections and that if an effective antiviral or anti-inflammatory treatment could be given at the onset of cold symptoms, this could possibly change the clinical outcome of the viral infection in COPD.

The development of such an experimental model in which causation is clearly defined and in which detailed clinical studies on mechanisms of disease can be carried out, will offer an invaluable tool to increase our understanding of the specific immunological and inflammatory events that lead COPD patients to exacerbate after viral infection. Moreover this model will offer the possibility to highlight and to test novel pharmacological targets able to treat and/or prevent viral induced COPD exacerbations.

Conclusions

Asthma and COPD are chronic inflammatory airway diseases responsible for increased morbidity and mortality worldwide mainly

during recurrent episodes of worsening of symptoms and lung function named exacerbations. Thus, the prevention of these exacerbations is one of the major task of the management and treatment of asthma and COPD.^{1, 2} The recent development of human experimental models of rhinovirus-induced asthma and COPD exacerbation in which causation is clearly defined and in which detailed clinical studies on mechanisms of disease can be carried out, is offering an invaluable tool to increase our understanding of the specific immunopathological events that lead to viral-induced asthma and COPD exacerbations. In the near future this model may offer the possibility to test novel pharmacological targets with the aim to treat and/or prevent viral induced COPD exacerbations.

Riassunto

Ruolo delle infezioni virali nelle riacutizzazioni di asma e broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)

Le infezioni virali rappresentano la causa più frequente di riacutizzazione sia di asma che di broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). Il rinovirus, ovvero il virus del comune raffreddore, è il virus più frequentemente identificato. Il recente sviluppo di modelli sperimentali umani di riacutizzazione di asma e BPCO rinovirus-indotta rappresenta uno strumento innovativo che può incrementare le nostre conoscenze sui meccanismi infiammatori ed immunologici che portano alla comparsa di una riacutizzazione in seguito ad una infezione virale. Inoltre questo modello consentirà di testare, in un contesto sperimentale controllato, nuovi farmaci per il trattamento e la prevenzione delle riacutizzazioni di BPCO. Scopo di questa revisione è esaminare il ruolo delle infezioni virali nelle riacutizzazioni di asma e BPCO ed in particolare focalizzeremo la nostra attenzione sui meccanismi infiammatori ed immunologici che portano alla comparsa di riacutizzazione nei pazienti con asma e BPCO dopo infezione virale delle vie aeree.

Parole chiave: Malattie virali - Asma - Broncopneumopatia cronica ostruttiva.

References

1. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for Asthma Management and Prevention. NHLBI/WHO Workshop report. 2002. NIH Publication 02-3659.: last update 2008.

2. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). National Institute of Health, National Heart Lung, and Blood Institute. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Workshop report. NIH Publication No 2701A 2001: last update 2008.
3. Mallia P, Message SD, Kebabze T, Parker HL, Kon OM, Johnston SL. An experimental model of rhinovirus induced chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: a pilot study. *Respir Res* 2006;7:116.
4. Message SD, Laza-Stanca V, Mallia P, Parker HL, Zhu J, Kebabze T, Contoli M *et al.* Rhinovirus-induced lower respiratory illness is increased in asthma and related to virus load and Th1/2 cytokine and IL-10 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13562-7.
5. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L *et al.* Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* 1995;310:1225-9.
6. Contoli M, Caramori G, Mallia P, Johnston S, Papi A. Mechanisms of respiratory virus-induced asthma exacerbations. *Clin Exper Allergy* 2005;35:137-45.
7. Corne JM, Marshall C, Smith S, Schreiber J, Sanderson G, Holgate ST *et al.* Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet* 2002;359:831-4.
8. Murray CS, Poletti G, Kebabze T, Morris J, Woodcock A, Johnston SL *et al.* Study of modifiable risk factors for asthma exacerbations: virus infection and allergen exposure increase the risk of asthma hospital admissions in children. *Thorax* 2006;61:376-82.
9. Green RM, Custovic A, Sanderson G, Hunter J, Johnston SL, Woodcock A. Synergism between allergens and viruses and risk of hospital admission with asthma: case-control study. *Bmj* 2002;324:763.
10. Bardin PG, Fraenkel DJ, Sanderson G, van Schalkwyk EM, Holgate ST, Johnston SL. Peak expiratory flow changes during experimental rhinovirus infection. *Eur Respir J* 2000;16:980-5.
11. Grunberg K, Timmers MC, de Klerk EP, Dick EC, Sterk PJ. Experimental rhinovirus 16 infection causes variable airway obstruction in subjects with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1375-80.
12. Message S, Laza-Stanca V, Zhu J, Kebabze T, Mallia P, Sanderson G *et al.* Relationship of viral load in nasal lavage (NL), induced sputum (IS) and bronchoalveolar lavage (BAL) to symptom scores and lung function following experimental rhinovirus (RV) infection in asthmatic and normal human volunteers. *Eur Resp J* 2004;24 (Suppl 48):483s.
13. Folkerts G, Busse WW, Nijkamp FP, Sorkness R, Gern JE. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1708-20.
14. Jafri HS, Chavez-Bueno S, Mejias A, Gomez AM, Rios AM, Nassi SS, Yusuf M *et al.* Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis* 2004;189:1856-65.
15. Xepapadaki P, Papadopoulos NG, Bossios A, Manoussakis E, Manoussakas T, Saxoni-Papageorgiou P. Duration of postviral airway hyperresponsiveness in children with asthma: effect of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:299-304.
16. Teran LM, Johnston SL, Schroder JM, Church MK, Holgate ST. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1362-6.
17. Fleming HE, Little FF, Schnurr D, Avila PC, Wong H, Liu J *et al.* Rhinovirus-16 colds in healthy and in asthmatic subjects: similar changes in upper and lower airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:100-8.
18. Einarsson O, Geba GP, Zhu Z, Landry M, Elias JA. Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airways hyperresponsiveness. *J Clin Invest* 1996;97:915-24.
19. Grunberg K, Smits HH, Timmers MC, de Klerk EP, Dolhain RJ, Dick EC *et al.* Experimental rhinovirus 16 infection. Effects on cell differentials and soluble markers in sputum in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:609-16.
20. Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW *et al.* The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 1989;56:839-47.
21. Grunberg K, Sharon RF, Hiltermann TJ, Brahim JJ, Dick EC, Sterk PJ *et al.* Experimental rhinovirus 16 infection increases intercellular adhesion molecule-1 expression in bronchial epithelium of asthmatics regardless of inhaled steroid treatment. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1015-23.
22. Papi A, Papadopoulos NG, Degitz K, Holgate ST, Johnston SL. Corticosteroids inhibit rhinovirus-induced intercellular adhesion molecule-1 up-regulation and promoter activation on respiratory epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:318-26.
23. Jarjour NN, Gern JE, Kelly EA, Swenson CA, Dick CR, Busse WW. The effect of an experimental rhinovirus 16 infection on bronchial lavage neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:1169-77.
24. Grunberg K, Timmers MC, Smits HH, de Klerk EP, Dick EC, Spaan WJ *et al.* Effect of experimental rhinovirus 16 colds on airway hyperresponsiveness to histamine and interleukin-8 in nasal lavage in asthmatic subjects in vivo. *Clin Exp Allergy* 1997;27:36-45.
25. Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, Lampe F, Johnston SL, Holgate ST. Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:879-86.
26. Message S, Laza-Stanca V, Mallia P, Kebabze T, Zhu J, Stanciu L *et al.* Blood and BAL T cell cytokine production during RV16 infection in normal and asthmatic human volunteers. *Eur Resp J* 2005;26 (Suppl 49):247s.
27. Papadopoulos NG, Stanciu LA, Papi A, Holgate ST, Johnston SL. A defective type 1 response to rhinovirus in atopic asthma. *Thorax* 2002;57:328-32.
28. Gern JE, Vrtis R, Grindle KA, Swenson C, Busse WW. Relationship of upper and lower airway cytokines to outcome of experimental rhinovirus infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2226-31.
29. Contoli M, Message SD, Laza-Stanca V, Edwards MR, Wark PA, Bartlett NW *et al.* Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat Med* 2006;12:1023-6.
30. Wark P, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V *et al.* Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 2005;201:937-47.
31. Talbot TR, Hartert TV, Mitchel E, Halasa NB, Arbogast PG, Poehling KA *et al.* Asthma as a risk factor for invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med* 2005;352:2082-90.
32. Biscione GL, Corne J, Chauhan AJ, Johnston SL. Increased frequency of detection of Chlamydia pneumoniae in asthma. *Eur Respir J* 2004;24:745-9.
33. Martin RJ, Kraft M, Chu HW, Berns EA, Cassell GH. A link between chronic asthma and chronic infection. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:595-601.
34. Rothfuchs AG, Trumstedt C, Wigzell H, Rottenberg ME. Intracellular bacterial infection-induced IFN-gamma is

- critically but not solely dependent on Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-IFN- α beta-STAT1 signaling. *J Immunol* 2004;172:6345-53.
35. Weigent DA, Huff TL, Peterson JW, Stanton GJ, Baron S. Role of interferon in streptococcal infection in the mouse. *Microb Pathog* 1986;1:399-407.
 36. Schiavoni G, Mauri C, Carlei D, Belardelli F, Pastoris MC, Proietti E. Type I IFN protects permissive macrophages from Legionella pneumophila infection through an IFN-gamma-independent pathway. *J Immunol* 2004;173:1266-75.
 37. Freudenberg MA, Merlin T, Kalis C, Chvatchko Y, Stubig H, Galanos C. Cutting edge: a murine, IL-12-independent pathway of IFN-gamma induction by gram-negative bacteria based on STAT4 activation by Type I IFN and IL-18 signaling. *J Immunol* 2002;169:1665-8.
 38. Gold JA, Hoshino Y, Hoshino S, Jones MB, Nolan A, Weiden MD. Exogenous gamma and alpha/beta interferon rescues human macrophages from cell death induced by Bacillus anthracis. *Infect Immun* 2004;72:1291-7.
 39. Niesel DW, Hess CB, Cho YJ, Klimpel KD, Klimpel GR. Natural and recombinant interferons inhibit epithelial cell invasion by Shigella spp. *Infect Immun* 1986;52:828-33.
 40. Carlin JM, Weller JB. Potentiation of interferon-mediated inhibition of Chlamydia infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infect Immun* 1995;63:1870-5.
 41. Devitt A, Lund PA, Morris AG, Pearce JH. Induction of alpha/beta interferon and dependent nitric oxide synthesis during Chlamydia trachomatis infection of McCoy cells in the absence of exogenous cytokine. *Infect Immun* 1996;64:3951-6.
 42. Decker T, Muller M, Stockinger S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:675-87.
 43. Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ *et al.* Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis* 2000;181:1875-84.
 44. Cheung D, Dick EC, Timmers MC, de Klerk EP, Spaan WJ, Sterk PJ. Rhinovirus inhalation causes long-lasting excessive airway narrowing in response to methacholine in asthmatic subjects in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1490-6.
 45. Gern JE, Calhoun W, Swenson C, Shen G, Busse WW. Rhinovirus infection preferentially increases lower airway responsiveness in allergic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1872-6.
 46. Donaldson GC, Seemungal TA, Patel IS, Lloyd-Owen SJ, Wilkinson TM, Wedzicha JA. Longitudinal changes in the nature, severity and frequency of COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2003;22:931-6.
 47. Decramer M, Rutten-van Molken MP, Dekhuijzen PN, Troosters T, van Herwaarden C, Pellegrino R *et al.* Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2005;365:1552-60.
 48. Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1987;106:196-204.
 49. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002;57:847-52.
 50. Kanner RE, Anthonisen NR, Connett JE. Lower respiratory illnesses promote FEV(1) decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease: results from the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:358-64.
 51. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1418-22.
 52. Papi A, Luppi F, Franco F, Fabbri LM. Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:245-51.
 53. Seemungal TA, Harper-Owen R, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Detection of rhinovirus in induced sputum at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000;16:677-83.
 54. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S *et al.* Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1618-23.
 55. Rohde G, Wiethege A, Borg I, Kauth M, Bauer TT, Gillissen A *et al.* Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax* 2003;58:37-42.
 56. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G *et al.* Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1114-21.
 57. Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Atmar RL, Hattotuwa K, Guntupalli KK *et al.* Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:968-75.
 58. Wilkinson TM, Hurst JR, Perera WR, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA. Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD. *Chest* 2006;129:317-24.
 59. Caramori G, Ito K, Contoli M, Di Stefano A, Johnston SL, Adcock IM *et al.* Molecular mechanisms of respiratory virus-induced asthma and COPD exacerbations and pneumonia. *Curr Med Chem* 2006;13:2267-90.
 60. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000;55:114-20.
 61. Papi A, Johnston SL. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF-kappaB-mediated transcription. *J Biol Chem* 1999;274:9707-20.
 62. Vignola AM, Campbell AM, Chanez P, Bousquet J, Paul-Lacoste P, Michel FB, Godard P. HLA-DR and ICAM-1 expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:689-94.
 63. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Turato G, Ruggieri MP, Roggeri A *et al.* Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1646-52.
 64. Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, Gamble E, Marin D, Turato G *et al.* Exacerbations of Bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:109-16.
 65. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Chrysofakis G, Kyriakou D, Siafakas NM. Changes in sputum T-lymphocyte subpopulations at the onset of severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2005;99:572-9.
 66. Caramori G, Romagnoli M, Casolari P, Bellettato C, Casoni G, Boschetto P *et al.* Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neu-

trophils during COPD exacerbations. *Thorax* 2003;58:348-51.

67. Papi A, Papadopoulos NG, Stanciu LA, Bellettato CM, Pinamonti S, Degitz K *et al*. Reducing agents inhibit rhinovirus-induced up-regulation of the rhinovirus receptor intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells. *Faseb J* 2002;16:1934-6.

68. Papi A, Contoli M, Gasparini P, Bristol L, Edwards MR, Chicca M *et al*. Role of xanthine oxidase activation and reduced glutathione depletion in rhinovirus induction of inflammation in respiratory epithelial cells. *J Biol Chem* 2008;283:28595-606.

69. Hurst JR, Donaldson GC, Wilkinson TM, Perera WR, Wedzicha JA. Epidemiological relationships between the common cold and exacerbation frequency in COPD. *Eur Respir J* 2005;26:846-52.

70. Robbins CS, Dawe DE, Goncharova SI, Pouladi MA, Drannik AG, Swirski FK *et al*. Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:202-11.

71. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciurba FC *et al*. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:469-73.

72. Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 2002;57:759-64.

73. Sajjan US, Jia Y, Newcomb DC, Bentley JK, Lukacs NW, LiPuma JJ *et al*. H. influenzae potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression. *FASEB J*. 2006;20:2121-3.

74. Donninger H, Glashoff R, Haitchi HM, Syce JA, Ghildyal R, van Rensburg E *et al*. Rhinovirus induction of the CXC chemokine epithelial-neutrophil activating peptide-78 in bronchial epithelium. *J Infect Dis* 2003;187:1809-17.

75. Johnston SL, Papi A, Bates PJ, Mastroradarde JG, Monick MM, Hunninghake GW. Low grade rhinovirus infection induces a prolonged release of IL-8 in pulmonary epithelium. *J Immunol* 1998;160:6172-81.

76. Laza-Stanca V, Stanciu LA, Message SD, Edwards MR, Gern JE, Johnston SL. Rhinovirus replication in human macrophages induces NF-kappaB-dependent tumor necrosis factor alpha production. *J Virol* 2006;80:8248-58.

77. Adler KB, Hendley DD, Davis GS. Bacteria associated with obstructive pulmonary disease elaborate extracellular products that stimulate mucin secretion by explants of guinea pig airways. *Am J Pathol* 1986;125:501-14.

78. Wilson R, Roberts D, Cole P. Effect of bacterial products on human ciliary function in vitro. *Thorax* 1985;40:125-31.

79. Read RC, Wilson R, Rutman A, Lund V, Todd HC, Brain AP *et al*. Interaction of nontypable Haemophilus influenzae with human respiratory mucosa in vitro. *J Infect Dis* 1991;163:549-58.

80. Seemungal TA, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Time course and recovery of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1608-13.

Comunicazioni scientifiche a congressi internazionali:

1. M. Contoli, **B. Marku**, G. Caramori, M. Saetta, L.M. Fabbri. *Lung Function Decline and Comorbidities in Patients with Fixed Airflow Obstruction Due to Asthma or COPD: Five Year Follow Up*. American Thoracic Society Annual Conference 2008 [Publication Page: A778]
2. Marco Contoli, Simonetta Baraldo, Erica Bazzan, Deborah Snijders, **Brunilda Marku**, Graziella Turato, Angelo Barbato, Marina Saetta, Alberto Papi.. *Modulatory effect of atopy on innate immune response to rhinovirus*. Scientific communication at European Respiratory Society Congress, 18-22 September 2010, Barcellona
3. Gaetano Caramori, Paolo Casolari, Gino Villetti, Sarah Giuffrè, Marco Contoli, **Brunilda Marku**, Anna Padovani, John Marwick, Kian Fan Chung, Peter J. Barnes, Ian M. Adcock, Alberto Papi. *Increased expression of aquaporin 5 in bronchial glands of smokers with or without COPD*. Scientific communication at European Respiratory Society Congress, 18-22 September 2010, Barcellona