

# NUOVI ORIZZONTI



1

LE NUOVE TERAPIE BIOLOGICHE E  
I BIOMARCATORI NELLE MALATTIE RESPIRATORIE

a cura di Gennaro D'Amato, Bruno Balbi



**AIPG**  
ASSOCIAZIONE  
ITALIANA  
PNEUMOLOGICI  
OSPITALIERI

## Sezione 1

### LE NUOVE TERAPIE BIOLOGICHE IN PNEUMOLOGIA

*a cura di* Gennaro D'Amato (Napoli)

*con la collaborazione di* Cecilia Calabrese (Napoli), Girolamo Pelaia (Catanzaro), Gennaro Liccardi (Napoli), Giovanni Passalacqua (Genova), Alessandro Vatrella (Napoli)

1. Introduzione: La biotecnologia applicata alla terapia dell'asma bronchiale e della broncopneumopatia cronica ostruttiva  
*Gennaro D'Amato* pag. 7
2. Vie di trasduzione dei segnali. Fattori trascrizionali. Antagonisti recettoriali  
*Girolamo Pelaia* » 11
3. Inibitori delle molecole di adesione  
*Cecilia Calabrese* » 27
4. Inibitori dei fattori di crescita  
*Cecilia Calabrese* » 35
5. Inibitori delle citochine e chemochine  
*Alessandro Vatrella* » 43
6. Immunoterapia specifica: nuove prospettive  
*Giovanni Passalacqua, Gennaro Liccardi* » 53
7. La terapia con omalizumab dell'asma bronchiale allergico  
*Gennaro D'Amato, Giovanni Passalacqua* » 61

## Sezione 2

### I BIOMARCATORI IN PNEUMOLOGIA

*a cura di* Bruno Balbi (Veruno, NO)

*con la collaborazione di* Antonio Spanevello (Cassano delle Murge, BA), Mario Malerba (Brescia), Massimo Corradi (Parma)

1. Utilità dei biomarcatori in Pneumologia, biomarcatori invasivi e non invasivi  
*Bruno Balbi* » 71
  2. Biomarkers nell'espettorato indotto  
*Antonio Spanevello* » 77
  3. Ossido nitrico esalato  
*Mario Malerba* » 91
  4. Esalato condensato  
*Massimo Corradi* » 103
-



Sezione 1

---

LE NUOVE TERAPIE BIOLOGICHE IN PNEUMOLOGIA

*a cura di*

Gennaro D'Amato (Napoli)

*con la collaborazione di*

Cecilia Calabrese (Napoli), Girolamo Pelaia (Catanzaro), Gennaro Liccardi (Napoli),  
Giovanni Passalacqua (Genova), Alessandro Vatrella (Napoli)



## INTRODUZIONE: LA BIOTECNOLOGIA APPLICATA ALLA TERAPIA DELL'ASMA BRONCHIALE E DELLA BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA

Gennaro D'Amato

*U.O.C. di Malattie Respiratorie e Allergiche, A.O. ad Alta Specializzazione e di Rilievo Nazionale "A. Cardarelli", Napoli*

Il notevole aumento di frequenza delle patologie ostruttive delle vie aeree inferiori come asma bronchiale e broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) che è stato registrato negli ultimi trenta anni nel mondo occidentale e le migliorate conoscenze delle peculiarità infiammatorie che ne caratterizzano il substrato patogenetico, hanno stimolato la ricerca biotecnologica a studiare e sintetizzare molecole applicabili alla terapia ed in grado di modulare in senso inibente le risposte flogistiche delle vie aeree. Occorrono però molti anni e molte sperimentazioni *in vitro* ed *in vivo* prima di rendersi conto se c'è possibilità di utilizzazione nella terapia di una determinata molecola.

Il coinvolgimento di numerose citochine nella patogenesi dell'infiammazione cronica e del rimodellamento strutturale delle vie aeree che caratterizzano l'asma è stato particolarmente studiato e almeno in parte delineato. Meno definito appare invece il ruolo delle citochine nella patogenesi della BPCO.

### Aspetti immunologici relativi all'eziopatogenesi dell'asma bronchiale allergico

L'asma è ritenuta una patologia caratterizzata da eventi flogistici acuti, cronici e di rimodellamento delle vie aeree. L'infiam-

mazione bronchiale permane anche durante i periodi di remissione dei sintomi e la persistenza dell'asma allergico è riconducibile alla flogosi bronchiale cronica IgE-mediata, che sollecita risposte immunologiche di tipo Th2, caratterizzate cioè dall'attivazione di quella sottopopolazione linfocitaria definita appunto Th2, che produce citochine, quali interleuchina (IL)-4, IL-5 e IL-13. I linfociti T di adulti non affetti da allergopatia vengono, invece, definiti di tipo Th1 perché producono in modo predominante interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mentre non sono in grado di stimolare la sintesi di IgE.

Si ritiene infatti che la differenza tra soggetti allergici-atopici e individui normali sia riconducibile ad un'alterata regolazione molecolare geneticamente controllata dalla produzione di IL-4 e IL-13. La sovraespressione dei geni, che controllano la sintesi e la liberazione di queste citochine, determinerebbe una loro produzione elevata e continuativa da parte dei linfociti T attivati dagli allergeni, mentre, sempre negli atopici, si osserva un deficit di produzione di IL-12 o di IFN- $\gamma$ . Il processo di sensibilizzazione allergica avverrebbe già nella vita intrauterina e nei primi mesi di vita. I linfociti Th2 cooperano con i linfociti B a livello delle strutture linfoidi, stimolandone l'attivazione con la conseguente produzione di IgE. Una volta prodotti questi anticorpi si riversano nel circolo ematico, dove possono

essere identificati attraverso tecniche immuno-diagnostiche.

Le IgE vanno a saturare i recettori ad alta e a bassa affinità presenti sulle membrane delle varie cellule coinvolte nelle reazioni allergiche (mastociti, basofili, eosinofili, etc.) legandosi a queste cellule grazie al loro frammento C $\epsilon$ R.

Il momento iniziale delle reazioni allergiche IgE-mediate è dato dal legame a ponte tra gli epitopi (determinanti antigenici) di un allergene con due molecole di IgE, legate a recettori adiacenti sulla superficie cellulare di mastociti nel lume delle vie aeree. Le due molecole di IgE, avvicinandosi tra loro per l'azione dell'antigene, consentono il determinarsi del contatto dei due recettori adiacenti sulla superficie dei mastociti su cui sono fissate e, quindi, l'attivazione di queste cellule infiammatorie.

A questo evento segue tutta una serie di reazioni enzimatiche, che danno luogo alla fine a un aumento di permeabilità della membrana stessa con apertura dei canali del calcio. Il calcio extracellulare, penetrato all'interno della cellula, si lega alla calmodulina, un recettore proteico che regola l'attività della ATPasi, la quale a sua volta idrolizza le molecole di ATP. La conseguente attivazione di meccanismi ATP-dipendenti garantisce l'energia occorrente per la degranulazione mastocitaria, con liberazione di mediatori chimici preformati, come istamina, triptasi, chimasasi, idrolasi acide, etc., che sono responsabili della reazione allergica immediata. In concomitanza con questi eventi, che portano alla degranulazione mastocitaria, si verifica anche l'attivazione calcio-dipendente della fosfolipasi di membrana, che metabolizza i fosfolipidi della membrana cellulare in lisofosfatidilcolina e in acido arachidonico. La prima sostanza viene acetilata dall'enzima acetiltransferasi, dando luogo alla formazione del fattore attivante le piastrine (*platelet activating factor* – PAF), mentre l'acido arachidonico, reso libero, è disponibile per la

conversione in “metabolici” della ciclossigenasi (prostaglandine e trombossani) e della lipossigenasi (leucotrieni). L'attivazione del mastocita innesca anche la sintesi di numerose altri elementi proinfiammatori come alcune citochine: IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ).

## Le citochine

Le citochine che intervengono nel processo infiammatorio delle vie aeree costituiscono agenti di induzione, amplificazione e cronicizzazione dello stimolo infiammatorio allergico e non-allergico.

A livello delle vie aeree, le citochine vengono prodotte da cellule infiammatorie (linfociti, eosinofili, neutrofilo, etc.) e da cellule strutturali (epitelio, endotelio, muscolatura liscia e fibroblasti). Esse svolgono un'azione importante nell'induzione e nella cronicizzazione dei processi infiammatori che caratterizzano le vie aeree in tutte le patologie respiratorie, e quindi anche nell'asma e nella BPCO. Tuttavia, non tutte le citochine sono proinfiammatorie. Infatti, alcune molecole, quali IL-10, IL-12 ed INF- $\gamma$  possono attenuare o prevenire l'infiammazione delle vie aeree.

La citochina IL-4, diffondendosi in circolo nel microambiente dei tessuti linfoidei, favorisce la differenziazione di linfociti T verso la serie Th2 e, quindi, amplifica e perpetua la risposta allergica. Gli eosinofili sono le cellule che svolgono il ruolo più importante in corso di infiammazione allergica e la loro attivazione e sopravvivenza sono aumentate ulteriormente da IL-5. I linfociti attivati, richiamati nella sede flogistica, contribuiscono a loro volta al mantenimento dell'infiammazione. Se lo stimolo allergenico è singolo e limitato nel tempo, l'evento flogistico, comprensivo della fase precoce e tardiva, si esaurisce in 48-72 ore. Se l'esposizione all'allergene è prolungata, si ha un persistere del processo, che diventa una vera e propria infiammazione cronica,

con conseguente danno tessutale, fino al cosiddetto rimodellamento delle vie aeree, caratterizzato dalla deposizione di collagene al di sotto della membrana basale dell'epitelio delle vie aeree.

Le citochine fungono da messengeri extracellulari, che esplicano le loro azioni attraverso la stimolazione di un'ampia ed eterogenea varietà di recettori espressi sulla membrana delle cellule infiammatorie e strutturali della parete bronchiale.

L'aumentata conoscenza del ruolo fisiopatologico di varie citochine nelle malattie atopiche ha fornito la base per lo sviluppo di agenti in grado di bloccare a vari livelli l'attività di questi mediatori dell'infiammazione (blocco dei fattori di trascrizione che consentono l'espressione delle citochine, blocco dei recettori a cui esse si legano, etc.). Sono, infatti, in corso studi atti a valutare l'utilizzo in terapia di citochine antiinfiammatorie come IL-10, IL-12 ed IFN- $\gamma$ , di inibitori di citochine pro-infiammatorie come IL-4, IL-13 e IL-5 nonché di inibitori delle chemochine, delle molecole di adesione e dei fattori trascrizionali.

Mentre si è ancora alla ricerca di agenti in grado di modulare l'azione proinfiammatoria di citochine come ad esempio la TNF- $\alpha$ , sono appena entrate nell'armamentario terapeutico specialistico le anti-IgE (omalizumab), anticorpi monoclonali murini umanizzati, in grado di bloccare, nell'asma a substrato allergico-atopico, le IgE circolanti, impedendone il legame ai recettori cellulari e la conseguente risposta infiammatoria-allergica.

### **Bibliografia essenziale**

- Barnes PJ. *Transcription factors in airway diseases*. Lab Invest 2006;86:867-72.
- Barnes PJ. *New therapies for asthma*. Trends Mol Med 2006;12:515-20.
- Brunekreef B, Smit J, de Jongste J, et al. *The prevention and incidence of asthma and mite allergy (PIAMA) birth cohort study: design and first results*. Pediatr Allergy Immunol 2002;13:55-60.
- Busse WW, Coffman RL, Gelfand EW, et al. *Mechanisms of persistent airway inflammation in asthma. A role for T cells and T-cell products*. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:388-93.
- Custovic A, Simpson A, Woodcock A. *Importance of indoor allergens in the induction of allergy and elicitation of allergic disease*. Allergy 1998;53:115-20.
- D'Amato G. *Editorial: Outdoor air pollution, climate and allergic respiratory diseases: evidence of a link*. Clin Exp Allergy 2002;32:1391-3.
- D'Amato G. *Role of anti-igE monoclonal antibody (omalizumab) in the treatment of allergic respiratory diseases*. Eur J Pharmacol 2006;533:302-7.
- Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NIH Publication 2006, available on [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com)
- Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, et al. *The role of allergy in the development of asthma*. Nature 1999;402:B1-17.
- Novak N, Bieber T. *Allergic and nonallergic forms of atopic diseases*. J Allergy Clin Immunol 2003;112:252-62.
- Polosa R, Holgate ST, eds. *Asthma: Current treatments. Therapeutic Strategies*. Oxford: Clinical Publishing 2007.
- Wagelie-Steffen AL, Kavanaugh AF, Wasserman SL. *Biologic therapies for the treatment of asthma*. Clin Chest Med 2006;27:133-47.





## VIE DI TRASDUZIONE DEI SEGNALI. FATTORI TRASCRIZIONALI. ANTAGONISTI RECETTORIALI

**Girolamo Pelaia**

*Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Malattie dell'Apparato Respiratorio,  
Università "Magna Graecia", Catanzaro*

### Introduzione

Nell'ambito degli eventi cellulari e molecolari responsabili della flogosi e del rimodellamento delle vie aeree caratterizzanti l'asma, un ruolo fondamentale è svolto da numerosissimi mediatori proinfiammatori, comprendenti autacoidi, citochine, chemiochine, fattori di crescita, ed anche anticorpi (IgE). Tali sostanze fungono da messaggeri extracellulari, che esplicano le loro azioni attraverso la stimolazione di un'ampia ed eterogenea varietà di recettori espressi sulla membrana delle cellule infiammatorie e strutturali della parete bronchiale. L'attivazione di queste molteplici popolazioni recettoriali, conseguente all'interazione con i rispettivi ligandi, si traduce nella convergenza, a livello intracellulare, su un numero relativamente limitato di vie di trasduzione del segnale, prevalentemente costituite da cascate enzimatiche fosforilanti (chinasi), che a loro volta attivano diversi fattori trascrizionali<sup>1</sup>. Questi ultimi regolano l'attività dei geni codificanti le proteine implicate nei fenomeni flogistici, nei processi proliferativi e nei meccanismi della morte cellulare programmata (apoptosi). Pertanto, i sistemi enzimatici di segnalazione intracellulare ed i fattori trascrizionali nucleari rappresentano dei target molecolari di rilevante importanza strategica ai fini della modulazione dell'in-

fiammazione e della cito-architettura delle vie aeree. Infatti, tali proteine costituiscono degli snodi cruciali su cui convergono i segnali biologici derivanti dalla stimolazione di complessi e variegati network recettoriali. Invece, sembrano essere intuitivamente meno fruttuosi gli approcci farmacologici basati sull'antagonismo di singoli recettori, proprio a causa della loro molteplicità, eterogeneità e ridondanza. In tal caso, l'eventuale successo terapeutico dipenderà essenzialmente dalla rilevanza e dall'insostituibilità, nel contesto della patogenesi dell'asma, di un particolare bersaglio recettoriale.

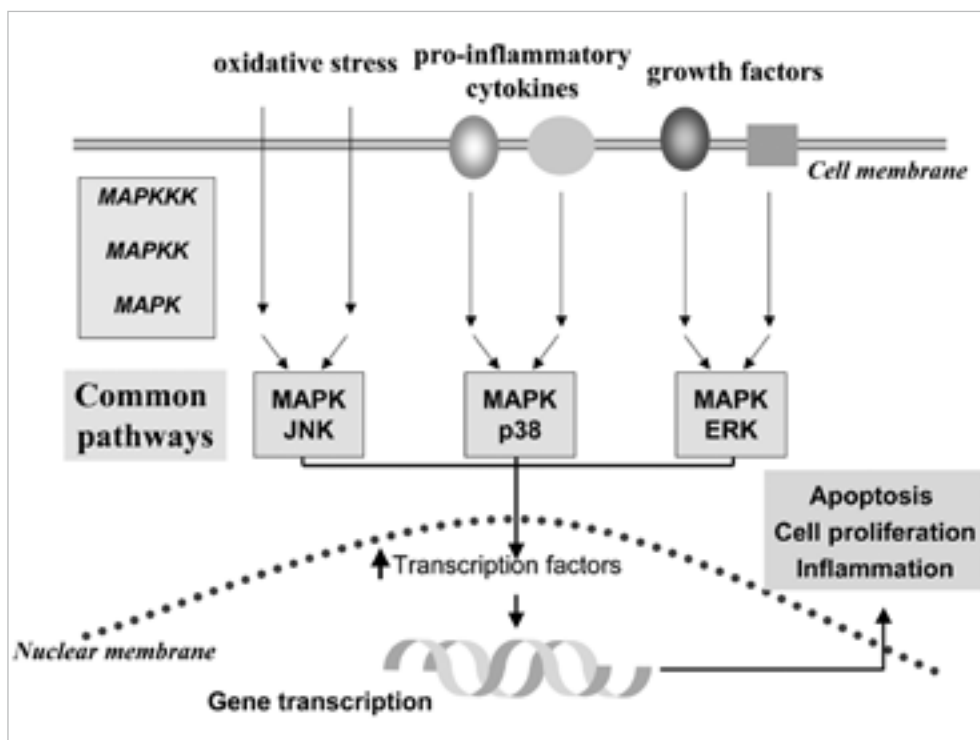
### Vie di trasduzione dei segnali

Nelle vie aeree, la propagazione ed amplificazione dei segnali flogogeni, proliferativi ed apoptotici, originati dalle interazioni delle molecole pro-asmatiche con i relativi recettori, dipendono in gran parte dall'attivazione di varie chinasi, comprendenti principalmente le *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), la *phosphoinositide 3-kinase* (PI-3K), la *protein chinasi C* (PKC), le *serin-treonin-chinasi* recettoriali, le tirosin-chinasi recettoriali e quelle non recettoriali, come le *Janus kinases* (JAK) attivatrici dei fattori STAT (*signal transducers and activators of transcription*), la *spleen tyrosine kinase* (Syk) e la *Lyn kinase*.

### Mitogen-activated protein kinases

Le *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) comprendono varie sottofamiglie quali *extracellular signal-regulated kinases* (ERK), soprattutto coinvolte nei fenomeni di differenziazione e proliferazione cellulare, *c-Jun N-terminal kinases* (JNK), prevalentemente implicate nelle risposte a vari tipi di stress (ossidativo, termico, ultravioletto, iperosmolare), e gli enzimi p38 operanti nei processi flogistici ed apoptotici<sup>2</sup>. Tutti i membri della famiglia MAPK condividono un comune modello di attivazione, basato su una catena sequenziale di fosforilazioni

(Fig. 1). Una volta attivate in seguito a duplice fosforilazione di specifici residui aminoacidici di treonina e tirosina, le MAPK a loro volta fosforilano vari substrati citoplasmatici e nucleari a livello di particolari siti serinici e treoninici; nel nucleo, molti dei target delle MAPK sono costituiti da fattori trascrizionali. Nella patogenesi dell'asma, le MAPK svolgono un ruolo rilevante per quanto riguarda la sintesi di citochine proinfiammatorie, l'attivazione, la chemiotassi e la sopravvivenza delle cellule immunoflogistiche, nonché nell'ambito delle funzioni delle cellule epiteliali bronchiali e nella mi-

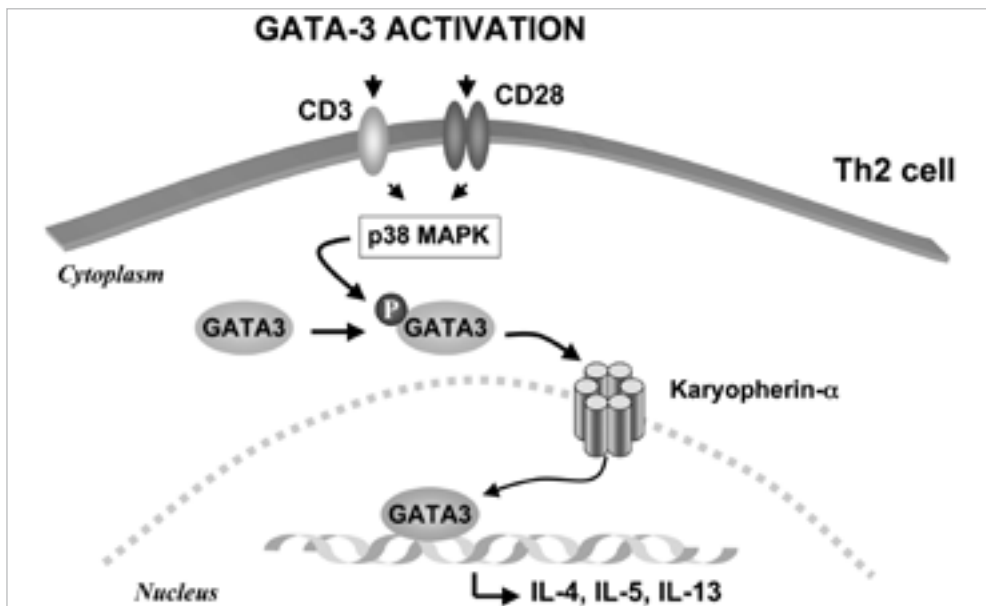


**Figura 1. Vie di trasduzione dei segnali mediate dalle MAP chinasi.** Vari stimoli extracellulari possono attivare le cascate enzimatiche fosforilative relative ai tre principali moduli delle MAP chinasi (ERK, JNK e p38), i cui substrati sono rappresentati da molteplici proteine citosoliche e nucleari, comprendenti anche fattori trascrizionali implicati nelle risposte cellulari infiammatorie, proliferative ed apoptotiche. La trasduzione dei segnali si realizza mediante una sequenza di fosforilazioni, rispettivamente catalizzate dalle MAP chinasi chinasi chinasi (MAPKKK), dalle MAP chinasi chinasi (MAPKK) e dalle MAP chinasi (MAPK).

togenesi dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce.

In particolare, l'attivazione del modulo chinasi ERK, conseguente alla stimolazione dei *T cell receptors*, è implicata nella differenziazione dei linfociti *T helper 'naive'* verso il fenotipo Th2. Inoltre, ERK è coinvolta anche nel reclutamento degli eosinofili e nel rimodellamento bronchiale, in quanto stimola la proliferazione dei fibroblasti subepiteliali ed induce iperplasia a livello della muscolatura liscia<sup>2</sup>. Recentemente è stato osservato che la interleuchina-13 (IL-13), le cui azioni biologiche erano precedentemente ritenute dipendenti esclusivamente dalla via JAK/STAT, è in grado di attivare ERK1/2 con modalità completamente indipendenti dalla stimolazione di STAT-6<sup>3</sup>. In particolare, ERK partecipa alla mediazione degli effetti della IL-13 nel contesto della flogosi e del rimodellamento delle vie

aeree, stimolando il rilascio sia delle chemiochine MIP (*macrophage inflammatory protein*)1 $\alpha$ /CCL-3, MIP1 $\alpha$ /CCL-4, MIP-2/CXCL-1 e RANTES (*regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*)/CCL-5, sia delle proteasi MMP-2, -9, -12, -14 e catepsina B<sup>3</sup>. Pure JNK contribuisce al rimodellamento tessutale sia favorendo la transizione dei fibroblasti polmonari verso un fenotipo miofibroblastico, sia stimolando la mitogenesi dei miociti delle vie aeree. Comunque, il sottogruppo di MAPK maggiormente attivo nella fisiopatologia cellulare dell'asma è indubbiamente p38. Infatti, p38 regola la migrazione dei mastociti verso gli antigeni e, mediante la fosforilazione del fattore trascrizionale GATA-3, promuove la produzione delle citochine Th2-linfocitarie IL-4, IL-5 ed IL-13 (Fig. 2). La MAPK p38 contribuisce inoltre, con modalità post-trascrizionali, a stabilizzare

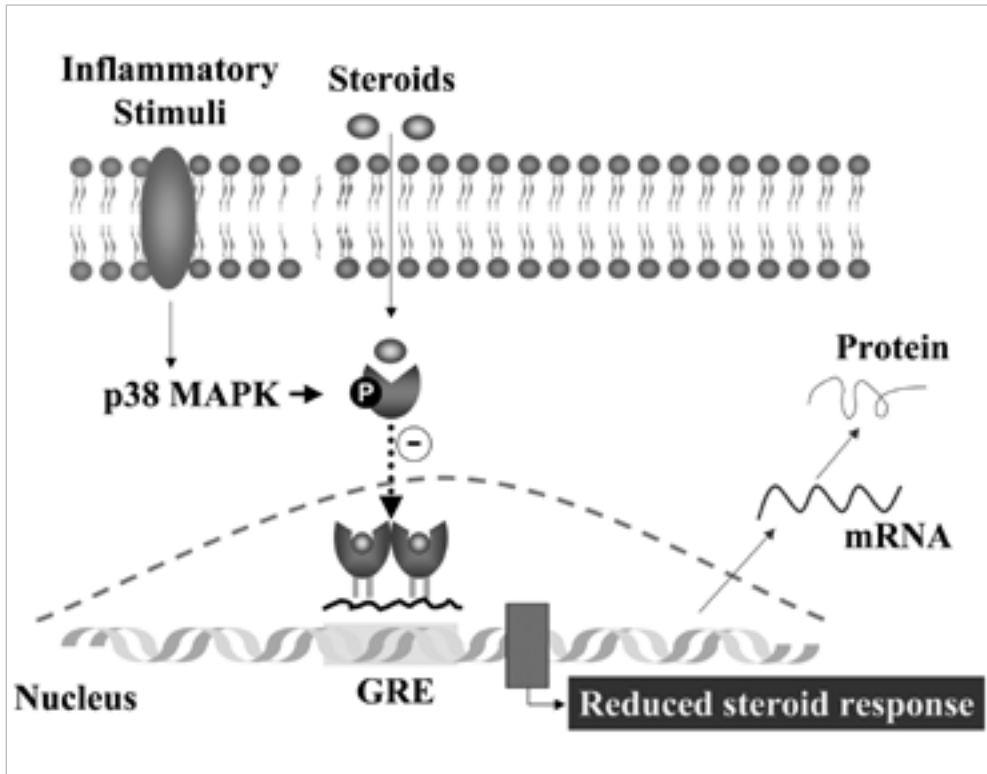


**Figura 2. Fosforilazione p38-dipendente del fattore trascrizionale GATA-3.** La trascrizione dei geni codificanti le citochine Th2-linfocitarie (IL-4, IL-5, IL-13) può essere attivata dalla costimolazione mediata dalle molecole CD3 e CD28, cui consegue l'attivazione della MAPK p38 e la fosforilazione p38-dipendente del fattore trascrizionale GATA-3.

gli RNA messengeri specifici per varie citochine e chemiochine quali *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 ed eotassina. p38 è anche in grado di prolungare sensibilmente la sopravvivenza degli eosinofili, ed al contrario induce l'apoptosi delle cellule epiteliali bronchiali<sup>4</sup>, essendo così implicata nei meccanismi responsabili del danno e della fragilità dell'epitelio delle vie aeree, tipici dell'asma. A livello dell'epitelio bronchiale p38 è pure coinvolta, insieme ad altre MAPK, nell'induzione della sintesi della IL-8 e della chemiochina RANTES.

L'inibizione delle MAPK, ed in particolare della sottofamiglia p38, pertanto rappresenta a livello sperimentale una strategia terapeutica anti-asmatica notevolmente interessante<sup>5</sup>. Tra i capostipiti degli inibitori piridinilimidazolici delle isoforme  $\alpha$  e  $\beta$  di p38, SB203580 si è rivelato in grado di attenuare preferenzialmente la sintesi di citochine Th2-linfocitarie e di indurre l'apoptosi degli eosinofili. Inoltre, gli inibitori della MAPK p38 prevengono l'apoptosi delle cellule epiteliali bronchiali causata dal fattore di crescita (*transforming growth factor*) TGF- $\beta$ <sup>4</sup>. SMP-534 è un composto a basso peso molecolare che, inibendo selettivamente l'attivazione di p38 indotta dal TGF- $\beta$ , riduce la produzione TGF- $\beta$ -dipendente di matrice extracellulare da parte di linee cellulari fibroblastiche; tuttavia, le eventuali potenzialità terapeutiche di SMP-534 nel rimodellamento delle vie aeree non sono ancora state valutate sperimentalmente. In ogni caso, gli approcci farmacologici utilizzando inibitori di p38 devono essere considerati con estrema cautela, in quanto il *knockout* del gene p38 $\alpha$  è responsabile, nel topo, di difetti dello sviluppo placentare. Inoltre, la funzione di segnalazione intracellulare svolta da p38 è verosimilmente essenziale per l'attuazione di una ottimale risposta immunitaria; infatti, i topi portatori di una mutazione nel gene codificante l'enzima MAPKAP-K2 (*mitogen-activated protein kinase-activated protein*

*kinase 2*), un importante substrato di p38, sono altamente suscettibili alle infezioni causate da microrganismi patogeni intracellulari come *Listeria monocytogenes*. Per evitare in parte questi problemi, potrebbe essere utile la disponibilità di composti somministrabili per via inalatoria. A tal riguardo è stato dimostrato in un modello murino di asma che l'oligonucleotide antisense inalabile ISIS 101757, specifico per p38 $\alpha$ , può inibire significativamente l'eosinofilia polmonare, l'iperresponsività bronchiale e l'ipersecrezione di muco indotte dall'ovalbumina<sup>5</sup>. D'altra parte, l'inibizione dell'attivazione fosforilazione-dipendente di p38 è comunemente attuata nella terapia pneumologica mediante l'impiego dei corticosteroidi, che inducono l'espressione della fosfatasi MKP-1 (*MAP kinase phosphatase-1*)<sup>6</sup>, responsabile della defosforilazione e conseguente inattivazione di p38 e delle altre MAPK. In seguito a tali interferenze sull'attività di p38, i cortisonici promuovono l'apoptosi degli eosinofili ed esplicano un'azione anti-apoptotica e protettiva a livello dell'epitelio bronchiale<sup>4</sup>. Tuttavia, un'eccessiva attivazione di p38 può addirittura contribuire, attraverso la fosforilazione del recettore dei glucocorticoidi e la conseguente inibizione della sua traslocazione nucleare, al fenomeno della resistenza agli steroidi riscontrabile in alcuni pazienti asmatici (Fig. 3). Per quanto concerne le sostanze attive sulle altre MAPK, l'inibitore di JNK SP600125 è in grado di attenuare, in topi sottoposti a sensibilizzazione allergica, l'infiltrazione bronchiale eosinofila e l'iperresponsività delle vie aeree<sup>7</sup>. Il composto PD98059, infine, che interferisce negativamente sull'attivazione delle vie mediate da ERK, nell'animale da esperimento riduce significativamente la produzione polmonare di cisteinil-leucotrieni stimolata dagli allergeni; inoltre, l'incubazione con PD98059 di eosinofili isolati da donatori allergici determina una marcata diminuzione della migrazione chemiotattica indotta dall'eotassina.



**Figura 3. Ruolo della MAPK p38 nell'asma steroide-resistente.** Nei pazienti asmatici l'iperattivazione della MAPK p38 da parte di intensi stimoli proinfiammatori può contribuire, mediante la fosforilazione dei recettori dei glucocorticoidi e la conseguente inibizione della loro traslocazione nucleare, ad una riduzione della risposta terapeutica ai corticosteroidi.

### Phosphoinositide 3-kinase

Molte cellule rispondono a vari stimoli (citochine, antigeni, molecole co-stimolatrici) attivando phosphoinositide 3-kinase (PI-3K), che fosforila i fosfoinositidi di membrana a livello della posizione D-3 dell'anello inositico, producendo così secondi messaggeri come il fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato ( $PIP_3$ )<sup>5</sup>. Quest'ultimo a sua volta recluta alcune serin-treonin chinasi (Akt/PKB, PDK1) che svolgono un ruolo rilevante nei processi di proliferazione, sopravvivenza e migrazione cellulare. I pazienti asmatici allergici presentano un'intensa attivazione di PI-3K a livello degli eosinofili, la cui risposta a vari fattori chemiotattici è in parte mediata

da questa via di trasduzione. Inoltre, PI-3K interviene nell'attivazione mastocitaria conseguente all'interazione IgE-FcεRI e contribuisce anche al rimodellamento delle vie aeree, inducendo la mitogenesi ed iperplasia delle cellule muscolari lisce. Mediante studi effettuati in ratti "Brown Norway" sensibilizzati, è stata evidenziata una soppressione della risposta broncostrittrice all'adenosina in seguito all'impiego dell'inibitore di PI-3K "wortmannin", che ha anche ridotto l'immunoflogosi ed il rilascio di perossidasi eosinofila. Anche LY294002, l'altro inibitore disponibile di PI-3K, impiegato per via endotracheale in modelli murini di asma è riuscito ad attenuare l'infiltrazione flogistica

delle vie aeree, la sintesi di IL-4, IL-5, IL-13, proteina cationica eosinofila ed eotassina, oltre che a ridurre l'iperreattività bronchiale e l'iperplasia delle *goblet cells*<sup>8</sup>. Analoghe osservazioni si riferiscono a topi immunosensibilizzati, nei quali il blocco sperimentale dell'attività di PI-3K ha determinato una diminuzione dell'iperresponsività bronchiale alla metacolina, dell'infiltrazione eosinofila delle vie aeree e della secrezione di IL-4 ed IL-5 nel liquido di lavaggio broncoalveolare.

### Protein chinasi C

Nella trasduzione dei segnali un'importante funzione ubiquitaria è svolta da protein chinasi C (PKC), una famiglia di serin-treonin chinasi che comprende numerose isoforme, così suddivise: PKC classiche ( $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\gamma$ ), attivate dai secondi messaggeri diacilglicerolo (DAG) e calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ); nuove PKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  e  $\theta$ ), stimulate da DAG; PKC atipiche ( $\zeta$  e  $\lambda/\iota$ ), che sono DAG/  $\text{Ca}^{2+}$ -indipendenti. Nell'uomo, la stimolazione allergenica induce un aumento dell'espressione e dell'attivazione dell'isoforma PKC $\zeta$  a livello degli eosinofili dell'espettorato indotto<sup>5</sup>. Inoltre, alterazioni della regolazione dell'attività di PKC sono state riscontrate nei macrofagi alveolari di pazienti asmatici. Tuttavia, i potenziali effetti degli inibitori di PKC attualmente disponibili, come LY333531, non sono ancora stati adeguatamente valutati in modelli sperimentali di asma.

### Serin-treonin chinasi recettoriali

Nell'ambito di questo gruppo di chinasi, una posizione di rilievo spetta ad alcuni recettori di membrana del TGF- $\beta$ . In particolare, il recettore di tipo II, dotato di intrinseca attività serin-treonin chinasica, in seguito all'interazione con il TGF- $\beta$  recluta e fosforila il recettore di tipo I<sup>9</sup>. Una volta attivato mediante fosforilazione, quest'ultimo a sua volta fosforila specifici residui di serina delle proteine intracellulari Smad-2 e Smad-3, che così

possono legare Smad-4; l'intero complesso Smad-2-3-4 trasloca quindi nel nucleo, dove si lega a sequenze nucleotidiche di consenso ed interagisce con altre proteine leganti il DNA, influenzando in tal modo la trascrizione dei geni target. In questo contesto, una funzione inibitrice è esercitata dalle proteine Smad-6 e soprattutto Smad-7, che si comporta come un antagonista del recettore del TGF- $\beta$  di tipo I. Il TGF- $\beta$  è uno dei principali fattori responsabili del rimodellamento bronchiale, ed infatti elevate concentrazioni della proteina Smad-2 fosforilata sono state rilevate in biopsie bronchiali derivanti da pazienti asmatici.

Sono stati sviluppati alcuni inibitori a basso peso molecolare del recettore di tipo I del TGF- $\beta$ ; tra questi, il composto SB-431542 è in grado di reprimere la traslocazione nucleare TGF- $\beta$ -dipendente di Smad-3<sup>10</sup>, così come la trascrizione dei geni codificanti la fibronectina ed altre proteine della matrice extracellulare. Pertanto, tale approccio farmacologico potrebbe rivelarsi molto utile nella prevenzione del rimodellamento strutturale delle vie aeree. Inoltre, una valida alternativa terapeutica potrebbe essere rappresentata dal potenziamento dell'espressione e/o attivazione della proteina regolatrice Smad-7. Tuttavia, è necessario considerare che l'attività biologica del TGF- $\beta$  non è esclusivamente mediata dalle proteine Smad, ma in parte dipende anche dall'attivazione delle MAPK.

### Tirosin chinasi recettoriali

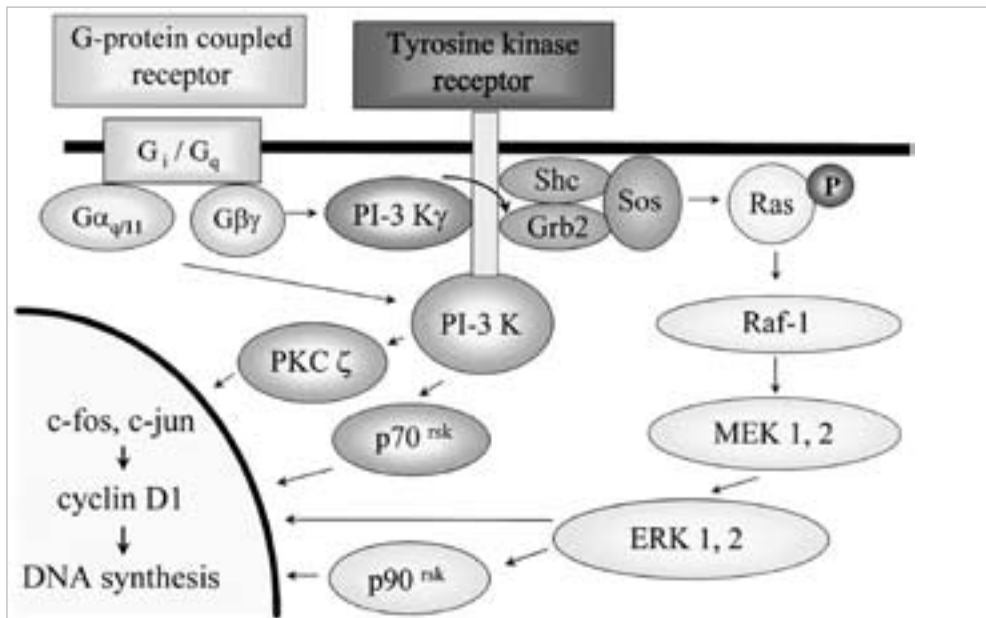
Sia le tirosin chinasi recettoriali che quelle non recettoriali sono fondamentali per l'attivazione e la proliferazione delle cellule infiammatorie e strutturali delle vie aeree. In particolare, il recettore del fattore di crescita EGF (EGFR) è una tirosin chinasi recettoriale transmembrana che, in seguito all'attivazione da parte del ligando, subisce una dimerizzazione e la conseguente autofosforilazione a livello di specifici residui tirosi-

nici, responsabile dell'innesco della cascata di trasduzione del segnale. Tale processo culmina nella stimolazione di altre chinasi, quali ERK, PI-3K e PKC<sup>8</sup>, principalmente implicate negli eventi proliferativi cellulari (Fig. 4). L'espressione di EGFR è incrementata nelle vie aeree dei pazienti asmatici, soprattutto a livello delle zone adiacenti ad aree epiteliali danneggiate. L'attivazione di EGFR si associa ad ipersecrezione di muco e fenomeni di rimodellamento strutturale bronchiale<sup>8</sup>. Gifitinib, un inibitore a basso peso molecolare della tirosin chinasi recettoriale EGFR specificamente sviluppato per la terapia del carcinoma polmonare, è anche in grado di sopprimere la produzione di muco. Inoltre, l'antagonista di EGFR AG-1478, instillato per via endotracheale in topi sensibilizzati all'ovalbumina, può inibire con

modalità concentrazione-dipendente l'infiltrazione eosinofila e l'iperresponsività delle vie aeree, la secrezione di muco e la deposizione di collagene. Attualmente sono anche disponibili inibitori (PTK787/ZK222584) dell'attività tirosin chinasi del recettore del fattore di crescita VEGF-A, la cui espressione è notevolmente aumentata nei tessuti bronchiali dei soggetti asmatici.

### Janus kinases

La famiglia delle tirosin chinasi non recettoriali *Janus kinases* (JAK) comprende vari sottogruppi (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2), attivati dall'oligomerizzazione dei recettori transmembrana delle citochine. Le code citoplasmatiche di questi ultimi si legano specificamente alle varie isoforme JAK, che fosforilano le proteine recettoriali in-



**Figura 4. Meccanismi di trasduzione dei segnali attivati dai fattori di crescita.** I fattori di crescita interagiscono prevalentemente con recettori dotati di attività tirosin-chinasi o con recettori accoppiati alle proteine G. Alla stimolazione recettoriale consegue l'attivazione di numerose chinasi, comprendenti la PI-3K, la PKC e la cascata Ras/Raf1/ERK1-2. Queste vie di trasduzione convergono nel nucleo, dove attivano vari fattori trascrizionali e la ciclina D<sub>1</sub>, responsabili dell'induzione della neosintesi di DNA e della proliferazione cellulare.



ducendo così il reclutamento e l'attivazione di uno dei sette membri della famiglia di fattori trascrizionali STAT. Ad esempio, la IL-4 e la IL-13, interagendo con i loro rispettivi recettori, stimolano JAK1, JAK3 e TYK2, determinando quindi la selettiva attivazione di STAT-6<sup>11</sup>. Nel topo, l'inibitore di JAK3 WHI-P97 è in grado di prevenire l'eosinofilia delle vie aeree e l'iperresponsività bronchiale indotte dalla stimolazione antigenica<sup>8</sup>. CP-690560 è un inibitore ancora più selettivo di JAK3, che si comporta come potente immunosoppressore in modelli sperimentali di trapianto. Poiché JAK3 svolge un ruolo cruciale nella differenziazione IL-4-mediata dei linfociti Th2, CP-690560 potrebbe essere utile considerato per eventuali applicazioni terapeutiche nell'asma allergico; tuttavia, per ottimizzare gli effetti bronchiali dovrebbe essere perseguito l'impiego della via inalatoria, anche al fine di evitare le possibili interferenze negative dell'inibizione di JAK3 sulle risposte immunitarie sistemiche.

### Syk e Lyn

La tirosin chinasi non recettoriale Syk ha un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale biologico generato dall'interazione delle IgE con i recettori mastocitari FcεRI; infatti, negli animali resi sperimentalmente privi di Syk risulta soppressa la degranulazione dei mastociti. Inoltre, Syk è coinvolta nelle risposte dei linfociti T e B alla stimolazione antigenica, ed anche nel prolungamento della vitalità degli eosinofili conseguente alle azioni della IL-5 e del GM-CSF. In modelli di asma sperimentalmente indotto nel ratto, la somministrazione per via aerosolica di oligonucleotidi antisenso specifici per Syk inibisce l'infiltrazione eosinofila bronchiale e l'espressione leucocitaria di varie molecole di adesione<sup>8</sup>. Sempre nel ratto, l'impiego per via orale dell'inibitore di Syk BAY61-3606 sopprime il broncospasma e l'edema bronchiale indotti da inalazione di allergeni.

Un altro inibitore a basso peso molecolare di Syk (R112), assunto per via nasale da pazienti affetti da rinite allergica stagionale, si è dimostrato capace di ridurre significativamente i sintomi rinitici provocati dall'esposizione agli antigeni pollinici<sup>12</sup>.

Nel complesso network di vie di trasduzione del segnale attivate dal legame delle IgE ai recettori FcεRI, il coinvolgimento di Syk è preceduto dall'intervento di un'altra tirosin chinasi denominata Lyn. Tale enzima è pure implicato nell'attivazione degli eosinofili e nei meccanismi di segnalazione intracellulare innescati dalla IL-5. Infatti, gli inibitori peptidici di Lyn, come PP1, esplicano un'azione anti-infiammatoria e deprimono le funzioni mastocitarie. Tuttavia, poiché l'espressione di Lyn e Syk è ampiamente diffusa nell'ambito del sistema immunitario, dovrebbe essere considerata con estrema cautela l'eventuale utilizzazione prolungata dei relativi inibitori di queste tirosin chinasi non recettoriali.

### Fattori trascrizionali

Le proteine proinfiammatorie iperesprese nel contesto del processo flogistico che caratterizza l'asma, quali citochine, chemiochine, molecole di adesione, enzimi e recettori rispettivamente responsabili della sintesi e degli effetti biologici di vari mediatori, sono codificate da geni regolati da diversi fattori trascrizionali<sup>1</sup>. Questi ultimi esplicano le proprie funzioni nel nucleo della cellula, interagendo con specifiche sequenze nucleotidiche regolatrici del DNA genomico (sequenze di consenso), ciascuna delle quali viene selettivamente riconosciuta dal rispettivo fattore (interazioni DNA-proteina). Dal punto di vista funzionale, i fattori trascrizionali possono essere suddivisi in tre gruppi: 1) fattori trascrizionali generali, responsabili della trascrizione genica basale; 2) fattori necessari per la trascrizione dei geni continuamente espressi (geni costitutivi); 3) fatto-

ri coinvolti nella modulazione dei geni inducibili, la cui trascrizione è finemente regolata in relazione ai diversi stadi dello sviluppo e/o ai vari momenti dell'attività cellulare. La caratteristica comune ai membri di quest'ultimo gruppo è quella di essere attivati da vie di trasduzione del segnale che originano dalla membrana cellulare o dal citoplasma per poi convergere, spesso in seguito all'intervento di varie chinasi intracellulari, nel nucleo. Tali fattori agiscono quindi come messaggeri nucleari, in quanto hanno la proprietà di convertire stimoli di breve durata provenienti dall'ambiente extracellulare in modificazioni relativamente protratte della trascrizione genica<sup>13</sup>.

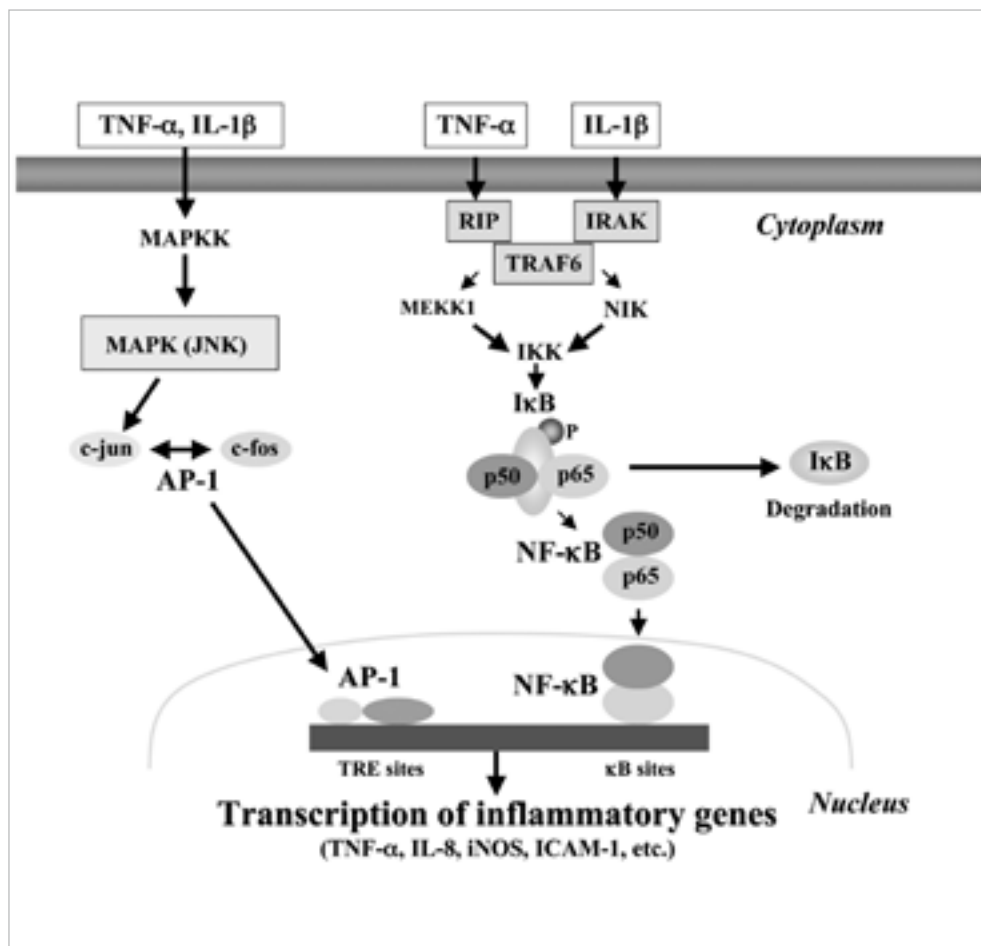
Il controllo dell'attività dei geni inducibili dipende da particolari sequenze nucleotidiche di consenso (*cis*-regolazione) che, in seguito all'interazione con specifici fattori trascrizionali (*trans*-regolazione), fungono da elementi stimolatori (attivatori o *enhancers*) o inibitori (repressori o *silencers*). Infatti, il legame dei vari fattori agli *enhancers* o ai *silencers* dei geni target è rispettivamente responsabile dell'accelerazione o del rallentamento della trascrizione basale. L'organizzazione strutturale dei fattori trascrizionali riflette queste loro prerogative funzionali; pertanto, essi sono costituiti da domini responsabili del legame alle rispettive sequenze nucleotidiche di consenso e domini direttamente implicati nella regolazione della trascrizione genica. I rapporti tra i vari fattori trascrizionali a volte sono mediati da "co-modulatori" (coattivatori o corepressori), cioè proteine che fungono da ponti di congiunzione consentendo così ad uno o più fattori di interagire con il complesso apparato molecolare della trascrizione. La trascrizione genica, oltre che attraverso un diretto legame dei fattori trascrizionali al DNA genomico, può anche essere modulata indirettamente, mediante interazioni proteina-proteina tra i diversi fattori. Globalmente, il ritmo di trascrizione di un gene inducibile,

e quindi la velocità di sintesi del corrispondente RNA messaggero (mRNA), dipende dallo specifico contesto determinato dai diversi fattori nucleari attivati che di volta in volta interagiscono tra loro e/o con il DNA genomico. Pertanto, nonostante per semplicità di comprensione e di esposizione abitualmente si tenda a rappresentare situazioni caratterizzate dall'attivazione di un singolo fattore trascrizionale operante su una unica sequenza nucleotidica di consenso, la realtà biologica risulta invece estremamente più complessa. Infatti, è necessario considerare che: a) le cellule sono contemporaneamente esposte a più stimoli, i quali attivano varie vie di trasduzione del segnale; b) esiste una complessa rete di comunicazioni (*cross-talk*) tra questi sistemi di trasduzione; c) l'azione di un singolo fattore trascrizionale è strettamente dipendente dal contesto generale in cui esso si inserisce in un determinato momento dell'attività cellulare.

I principali fattori trascrizionali implicati nella patogenesi dell'asma e nei meccanismi d'azione dei farmaci antiasmatici sono i seguenti: *nuclear factor-kB* (NF-kB), *activator protein-1* (AP-1), *nuclear factor of activated T-cells* (NF-AT), STAT, GATA-3, *CAAT/enhancer binding proteins* (C/EBP) e *glucocorticoid receptor* (GR).

### **Nuclear factor-kB**

*Nuclear factor-kB* (NF-kB), così denominato perché originariamente identificato nei linfociti B di topo come fattore di regolazione dell'espressione della catena leggera k delle immunoglobuline, è presente nella maggior parte delle cellule e svolge un ruolo centrale nelle risposte immunitarie ed infiammatorie. In particolare, NF-kB stimola la trascrizione di numerosi geni inducibili codificanti proteine di rilevante importanza nell'ambito del processo flogistico caratterizzante l'asma, quali citochine proinfiammatorie e fattori di crescita (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, GM-CSF), chemiochine (IL-8, RANTES, eotassi-



**Figura 5. Fattori trascrizionali NF-κB ed AP-1.** I fattori trascrizionali NF-κB ed AP-1 vengono attivati nel citoplasma da stimoli extracellulari, quali le citochine proinfiammatorie TNF- $\alpha$  ed IL-1 $\beta$ , che esplicano i loro effetti biologici attraverso vie di trasduzione dei segnali mediate da varie chinasi intracellulari. L'attivazione di NF-κB è operata dalla chinasi IKK2, che fosforila l'inibitore di NF-κB (I $\kappa$ B $\alpha$ ) inducendone così la coniugazione con ubiquitina e la conseguente degradazione proteolitica. Ciò consente l'attivazione e la traslocazione nucleare di NF-κB, che tramite la sua subunità p65 può quindi interagire con specifiche sequenze nucleotidiche di consenso, stimolando così la trascrizione dei geni target codificanti proteine proinfiammatorie. L'espressione di queste ultime dipende anche dall'attivazione di AP-1, conseguente alla fosforilazione della sua componente c-jun, catalizzata dalla MAP chinasi JNK.

na, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ ) e molecole di adesione (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) coinvolte nel reclutamento delle cellule infiammatorie, nonché enzimi responsabili della sintesi di vari mediatori (iNOS, COX-2, cPLA $_2$ ). NF-κB è costituito da due subunità protei-

che, il cui peso molecolare è rispettivamente di 65 kDa (p65) e 50 kDa (p50)<sup>1</sup>. Nella sua forma inattiva, questo fattore trascrizionale risiede nel citoplasma legato alla proteina inibitrice I $\kappa$ B (Fig. 5), che maschera le sequenze aminoacidiche di NF-κB responsabi-

li del passaggio attraverso la membrana nucleare (segnali di localizzazione nucleare). La fosforilazione di I $\kappa$ B ad opera della I $\kappa$ B chinasi-2 (IKK2) comporta la dissociazione da NF- $\kappa$ B, con la conseguente attivazione e migrazione di quest'ultimo nel nucleo<sup>14</sup>, dove interagisce con una specifica sequenza nucleotidica di consenso (GGGACTTTCC) localizzata nella regione regolatrice (promoter) dei geni target. Una volta dissociato, I $\kappa$ B viene rapidamente distrutto per degradazione proteolitica. Il legame di NF- $\kappa$ B al DNA è strettamente associato all'acetilazione degli istoni, che contribuisce notevolmente a rendere trascrizionalmente attiva la cromatina nucleare. Al contrario, i corticosteroidi inibiscono l'accesso di NF- $\kappa$ B al DNA in quanto inattivano le istone acetil-transferasi (HAT), ma soprattutto reclutano ed attivano le istone deacetilasi (HDAC), che reprimono la trascrizione genica mediante l'induzione del superavvolgimento e della conseguente condensazione nucleosomica del DNA<sup>1</sup>.

Stimoli di varia natura implicati nella patogenesi dell'asma, quali citochine proinfiammatorie, radicali ossidanti generati da cellule infiammatorie come gli eosinofili, e vari tipi di virus (virus influenzali, rhinovirus e adenovirus), sono in grado di attivare NF- $\kappa$ B<sup>5</sup>. In realtà, alcune delle stesse citochine regolate da NF- $\kappa$ B (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , etc.) possono indurre l'espressione e l'attivazione di questo fattore, innescando così un circuito di automantenimento della risposta flogistica che contribuisce alla persistenza ed all'amplificazione del processo infiammatorio associato all'asma. Infatti, nelle vie aeree dei pazienti asmatici l'espressione della forma attiva di NF- $\kappa$ B è significativamente aumentata a livello dell'epitelio e delle cellule immuno-flogistiche, soprattutto della linea macrofagica. NF- $\kappa$ B, pertanto, e soprattutto la chinasi IKK2 responsabile della sua attivazione, rappresentano interessanti target terapeutici. In topi sensibilizzati all'ovalbumina, l'instillazione endotracheale di oligodeos-

sinucleotidi che riproducono la sequenza di consenso dove si lega NF- $\kappa$ B, bloccando così l'interazione naturale del fattore trascrizionale con il DNA genomico, attenua la flogosi allergica, l'iperresponsività bronchiale, la secrezione di muco e la produzione di eotassina e di IL-5 e -13. Recentemente sono stati sviluppati vari inibitori a basso peso molecolare di IKK2, in grado di sopprimere il rilascio di numerose citochine e chemochine. Tuttavia, in relazione all'importanza di NF- $\kappa$ B nelle risposte immunitarie, l'inibizione di questo fattore trascrizionale potrebbe esporre al rischio di gravi infezioni; ciò è stato confermato in modelli sperimentali murini, nei quali la delezione dei geni codificanti NF- $\kappa$ B ha determinato fatali setticemie. Per la terapia dell'asma, gli inibitori di IKK2 potrebbero quindi essere eventualmente utilizzati soltanto per via inalatoria.

### **Activator protein-1**

*Activator protein-1* (AP-1) è una proteina nucleare eterodimerica, costituita dall'associazione dei prodotti dei proto-oncogeni *c-fos* e *c-jun*, che interagisce con specifiche sequenze nucleotidiche di consenso (TGAC/GTCA) presenti in numerosi geni. L'attivazione di AP-1 dipende dal sottogruppo JNK delle MAPK, che fosforila la proteina Jun. Un'aumentata espressione di *c-fos* è stata evidenziata nell'epitelio delle vie aeree di pazienti asmatici<sup>15</sup>, ed è noto che molti dei geni controllati da NF- $\kappa$ B sono anche regolati da AP-1 (Fig. 5). Pertanto, è molto verosimile che l'induzione dello specifico pattern di geni infiammatori iperespressi nell'asma dipenda dalla simultanea attivazione di questi due fattori trascrizionali, che agirebbero quindi cooperativamente.

### **Nuclear factor of activated T-cells**

Presente soprattutto nei linfociti T, *nuclear factor of activated T-cells* (NF-AT) è attivato per defosforilazione dalla fosfatasi Ca<sup>2+</sup>-

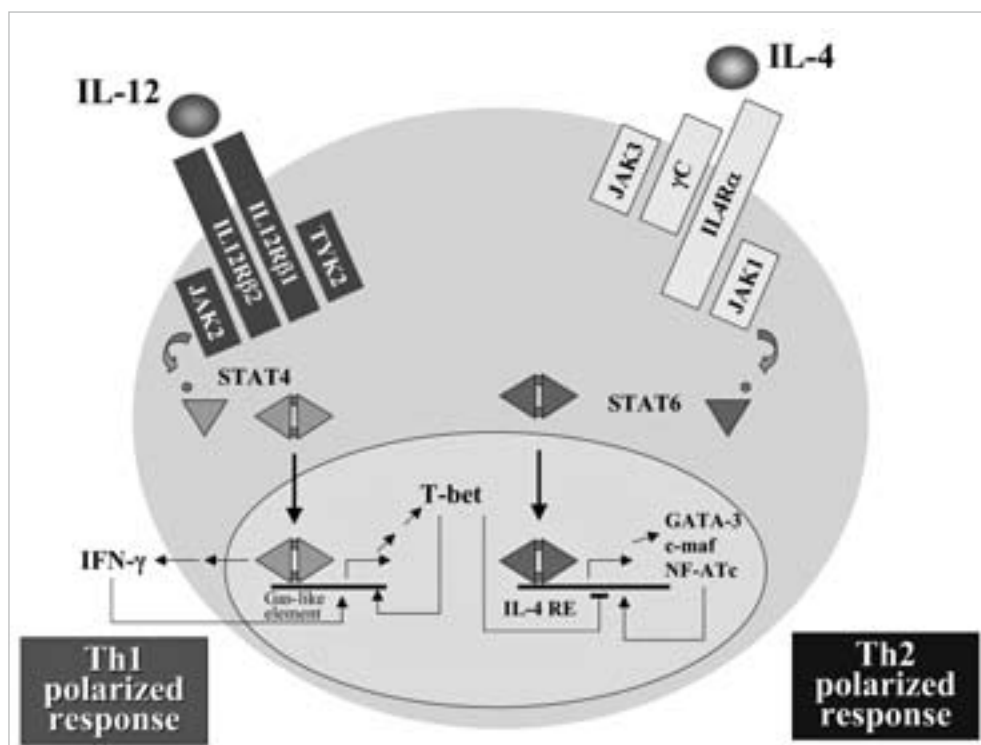
dipendente calcineurina, che ne induce il trasporto dal citoplasma al nucleo <sup>16</sup>, dove stimola la trascrizione dei geni codificanti le IL-2, 4 e 5. In particolare, l'espressione della IL-2 è stimolata da un complesso trascrizionale formato da NF-AT ed AP-1. Anche nella regolazione del gene della IL-4 NF-AT coopera con altri fattori trascrizionali quali AP-1, il prodotto del proto-oncogene *c-maf*, GATA-3 ed altri. Multifattoriale è pure l'attivazione del gene della IL-5, che dipende da complesse interazioni tra NF-AT, NF- $\kappa$ B, AP-1 ed altre proteine nucleari.

L'attività di NF-AT è repressa dagli inibitori della calcineurina, come la ciclosporina A ed il tacrolimo, che nell'asma possono

esplicare effetti anti-infiammatori. Tuttavia, nei pazienti asmatici l'impiego della ciclosporina è notevolmente limitato dalla sua nefrotossicità. La rapamicina (sirolimo) è caratterizzata da un'azione simile a quella degli inibitori della calcineurina e non è nefrotossica, ma può indurre iperlipidemia.

### Signal transducers and activators of transcription

Come è già stato menzionato, le chinasi JAK promuovono la fosforilazione ed attivazione dei vari membri della famiglia *signal transducers and activators of transcription* (STAT), inducendone la dimerizzazione e la migrazione dal citoplasma nel nucleo <sup>17</sup>, dove essi regolano la trascrizione di specifici



**Figura 6. Fattori trascrizionali implicati nelle risposte Th-linfocitarie.** La sintesi delle citochine Th2 è stimolata dai fattori trascrizionali STAT-6, GATA-3 e *c-maf*, attivati dalla IL-4. Il "pattern" secretorio di tipo Th1 è invece attivato dai fattori trascrizionali STAT4 e T-bet, stimolati dalla IL-12 e responsabili della produzione di IFN- $\gamma$ .

geni target legandosi a sequenze nucleotidiche di consenso localizzate nel promoter. Il sistema JAK/STAT è costituito da varie diramazioni, ciascuna delle quali è selettivamente attivata da alcune citochine piuttosto che da altre (Fig. 6). Ad esempio, l'attivazione nei linfociti Th2 del gene della IL-4, indotta da questa stessa citochina, è dipendente dalla stimolazione JAK1 e JAK3-mediata del fattore STAT-6. Infatti, inattivando sperimentalmente il gene codificante STAT-6, è possibile ottenere in topi sensibilizzati un marcato decremento della produzione allergene-dipendente di IgE, nonché una significativa riduzione della risposta citochinica di tipo Th2 e dell'iperresponsività delle vie aeree. Tuttavia, attualmente si sta rivelando ancora difficile lo sviluppo di inibitori a basso peso molecolare di STAT-6.

La IL-12, invece, stimola con modalità JAK2/STAT4-dipendente la trascrizione del gene dell'interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), una citochina fondamentale per l'induzione ed il mantenimento del fenotipo Th1 (Fig. 6). Pertanto, il "knockout" del gene codificante STAT4 abolisce la risposta alla IL-12 ed orienta il fenotipo linfocitario verso un pattern alternativo di tipo Th2. La IL-5, infine, sembra in grado di attivare vari membri della famiglia STAT, quali STAT1, STAT3 e STAT5. A tal proposito, nell'epitelio bronchiale di pazienti asmatici è stata documentata, rispetto ai soggetti di controllo, una maggiore attivazione di STAT1 correlata ad una aumentata espressione delle proteine codificate dai geni target di questo fattore trascrizionale, compresa la molecola di adesione ICAM-1<sup>18</sup>.

### GATA-3

Questo fattore trascrizionale svolge un ruolo fondamentale nella differenziazione dei linfociti Th2 e nella loro attività secretiva (Fig. 6). Bloccando la sintesi di GATA-3 mediante specifici oligonucleotidi anti-senso, si può prevenire nel topo la risposta immunitaria Th2-mediata e la conseguente infiammazione

eosinofila; attualmente non è però disponibile alcun antagonista di GATA-3<sup>7</sup>. Pertanto, un approccio terapeutico alternativo potrebbe essere rappresentato dal potenziamento dell'espressione e/o funzione del fattore trascrizionale T-bet, deficitario nell'asma, caratterizzato da un'attività biologica opposta a quella di GATA-3; T-bet infatti induce la produzione di IFN- $\gamma$  e la conseguente differenziazione dei linfociti Th1 (Fig. 6).

### CAAT/enhancer binding proteins

La famiglia delle proteine *CAAT/enhancer binding proteins* (C/EBP) è costituita da alcuni fattori trascrizionali che si legano in forma dimerica ad una specifica sequenza nucleotidica di consenso (ATTGCGCAAT), comprendente la cosiddetta "CAAT-box", presente nella regione regolatrice di numerosi geni. In particolare, l'isoforma C/EBP $\alpha$  è implicata nella modulazione della flogosi e della proliferazione cellulare. A tal riguardo, C/EBP $\alpha$  è in grado di influenzare negativamente l'espressione NF-kB-dipendente dei geni proinfiammatori. Inoltre, C/EBP $\alpha$  reprime la proliferazione delle cellule muscolari lisce delle vie aeree attraverso l'induzione dell'inibitore del ciclo cellulare p21<sup>waf1/cip1</sup>. Nella muscolatura liscia bronchiale normale, i corticosteroidi e gli agonisti  $\beta_2$ -adrenergici concorrono sinergicamente ad attivare il gene codificante p21<sup>waf1/cip1</sup>. Recenti evidenze indicano che nei pazienti asmatici i miociti delle vie aeree possano essere privi della proteina C/EBP $\alpha$ , risultando pertanto refrattari all'azione antiproliferativa dei cortisonici<sup>19</sup>. Il deficit di questo fattore trascrizionale sarebbe conseguente ad alterazioni della traduzione del relativo mRNA, piuttosto che ad una diminuita trascrizione del gene della C/EBP $\alpha$ . Ripristinando sperimentalmente l'espressione di C/EBP $\alpha$ , anche in cellule muscolari lisce provenienti da pazienti asmatici è possibile rilevare *in vitro* la risposta inibitrice ai glucocorticoidi. Ciò suggerisce che C/EBP $\alpha$  possa rappresentare

un ulteriore target per le future prospettive di terapia dell'asma.

### Glucocorticoid receptors

I *Glucocorticoid receptors* (GR) sono membri di una vasta famiglia di proteine nucleari, comprendente i recettori di vari steroidi, degli ormoni tiroidei e di alcune vitamine (A e D), i quali in seguito all'attivazione ad opera dei rispettivi ligandi si comportano da fattori trascrizionali capaci di modulare l'espressione di diversi geni target. Il legame dei glucocorticoidi ai GR induce la loro dissociazione da alcune proteine regolatrici, appartenenti alla famiglia delle *heat shock proteins* (hsp90, hsp70 ed altre), e la migrazione dal citoplasma nel nucleo, dove essi interagiscono in forma dimerica con specifiche sequenze nucleotidiche (GGTA-CAGGATGTTCT) del DNA genomico denominate GRE (*glucocorticoid response elements*). Tuttavia, l'azione anti-asmatica dei corticosteroidi è soltanto in minima parte dovuta alla diretta induzione della trascrizione di geni anti-infiammatori, come quelli codificanti la lipocortina-1 e l'inibitore di NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), mentre in larga misura consegue alla repressione trascrizionale dei geni proinfiammatori dovuta a meccanismi indiretti, indipendenti dal legame dei GR ai GRE e prevalentemente mediati dal reclutamento e dall'attivazione degli enzimi HDAC<sup>6</sup>.

### Antagonisti recettoriali

Nell'ambito delle nuove prospettive terapeutiche relative al trattamento dell'asma, l'antagonismo dei recettori di membrana delle citochine e chemiochine proinfiammatorie può rappresentare una strategia alternativa o complementare a quella finalizzata all'inibizione delle vie intracellulari di trasduzione del segnale e/o dei fattori trascrizionali nucleari. Ovviamente, le probabilità di successo di questo approccio sono strettamente dipendenti dall'importanza e dall'unicità dei me-

canismi molecolari attivati dalla stimolazione del recettore antagonizzato. A tal riguardo, i risultati sperimentali più promettenti si riferiscono all'impiego degli inibitori dei recettori delle IL-4 e -13, ed all'utilizzo di alcuni antagonisti recettoriali delle chemiochine.

### Antagonisti dei recettori della IL-4 e della IL-13

Da qualche anno è stato intrapreso lo sviluppo di anticorpi monoclonali diretti contro la catena  $\alpha$  del recettore della IL-4 (IL-4R $\alpha$ ); il vantaggio di questo approccio deriva dalla possibilità di inibire gli effetti biologici di entrambe le interleuchine 4 e 13, che condividono la proprietà di legarsi alla stessa subunità recettoriale  $\alpha$ . È stato inoltre prodotto un doppio mutante della IL-4 (BAY-16-9996), ottenuto mediante sostituzione dell'arginina 121 e della tirosina 124 con due residui di acido aspartico, che funge da antagonista recettoriale competitivo della IL-4 e della IL-13. Tuttavia, sebbene i primi *trials* effettuati documentino una buona tollerabilità e sicurezza del composto, il suo impiego clinico è limitato dalla breve emivita e dalla indisponibilità di formulazioni non iniettabili. Particolari varianti solubili dei recettori delle IL-4 e -13 possono inibire l'attività di queste citochine. Il farmaco altrakinecept non è un vero e proprio antagonista recettoriale, in quanto è stato realizzato clonando la porzione extracellulare della forma umana di IL-4R $\alpha$ <sup>20</sup>. Altrakinecept si lega comunque alla IL-4 impedendo così la sua interazione con il recettore di membrana, responsabile delle azioni biologiche della citochina. Purtroppo, gli effetti anti-asmatici inizialmente evidenziati non sono stati confermati dai successivi *trials* clinici; ciò è verosimilmente dovuto alla rapida degradazione proteolitica del composto nelle vie aeree, che quindi compromette la capacità di inibire completamente l'attività della IL-4. La catena  $\alpha 2$  del recettore della IL-13 (IL-13R $\alpha 2$ ) ha un'elevata affinità per questa

citochina di cui inibisce gli effetti riducendo, in modelli sperimentali murini, la sintesi di IgE, l'eosinofilia polmonare e l'iperresponsività bronchiale.

### Inibitori dei recettori delle chemiochine

Le chemiochine sono mediatori proteici di piccole dimensioni molecolari, che inducono la chemiotassi delle cellule infiammatorie in seguito alla stimolazione di recettori di membrana accoppiati alle proteine G. Uno dei recettori delle chemiochine maggiormente espressi nelle vie aeree dei pazienti asmatici è CCR3, presente sulla superficie di eosinofili, mastociti e linfociti Th2, ed attivato da eotassina, RANTES ed MCP4<sup>12</sup>. Diversi antagonisti di CCR3 a basso peso molecolare, quali UCB35625, SB-297006 e SB-328437, inibiscono efficacemente il reclutamento polmonare degli eosinofili in modelli sperimentali di asma allergico. L'attività del recettore CXCR4, selettivamente espresso dalle cellule Th2, è invece antagonizzata dal composto AMD3100, che nel topo è in grado di ridurre l'eosinofilia polmonare e l'associata iperresponsività delle vie aeree indotte dal "challenge" allergico.

### Conclusioni

Le recenti acquisizioni sulla natura e sul funzionamento sia dei recettori di citochine e chemiochine, sia dei sistemi intracellulari di trasduzione dei segnali e dei fattori trascrizionali, stanno consentendo di compiere notevoli progressi nella comprensione degli eventi molecolari implicati nella patogenesi dell'asma e nei meccanismi d'azione dei farmaci antiasmatici. Inoltre, queste conoscenze stanno aprendo interessanti prospettive per quanto riguarda lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, finalizzate ad interferire sull'attivazione dei suddetti fenomeni biologici. In particolare, la disponibilità di composti somministrabili per via inalatoria dovrebbe permettere di intervenire con modalità tessuto-specifiche a livello delle

vie aeree, senza compromettere la dinamica delle risposte immuno-flogistiche sistemiche dell'organismo.

### Bibliografia

- <sup>1</sup> Barnes PJ. *Transcription factors in airway diseases*. Lab Invest 2006;86:867-72.
- <sup>2</sup> Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, et al. *Mitogen-activated protein kinases and asthma*. J Cell Physiol 2005;202:642-53.
- <sup>3</sup> Lee PJ, Zhang X, Shan P, et al. *ERK1/2 mitogen-activated protein kinase selectively mediates IL-13-induced lung inflammation and remodelling in vivo*. J Clin Invest 2006;116:163-73.
- <sup>4</sup> Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, et al. *Effects of transforming growth factor- $\beta$  and budesonide on mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis in airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol 2003;29:12-8.
- <sup>5</sup> Adcock IM, Chung KF, Caramori G, et al. *Kinase inhibitors and airway inflammation*. Eur J Pharmacol 2006;533:118-32.
- <sup>6</sup> Barnes PJ. *Corticosteroid effects on cell signalling*. Eur Respir J 2006;27:413-26.
- <sup>7</sup> Barnes PJ. *Novel signal transduction modulators for the treatment of airway diseases*. Pharmacol Ther 2006;109:238-45.
- <sup>8</sup> Wong WSF. *Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma*. Curr Opin Pharmacol 2005;5:264-71.
- <sup>9</sup> Nakao A. *Is TGF- $\beta$ 1 the key to suppression of human asthma?* Trends Immunol 2001;22:115-8.
- <sup>10</sup> Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. *The regulatory role of TGF- $\beta$  in airway remodeling in asthma*. Immunol Cell Biol 2007;85:348-56.
- <sup>11</sup> Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, et al. *Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connection maps*. Science 2003;300:1527-8.
- <sup>12</sup> Barnes PJ. *New therapies for asthma*. Trends Mol Med 2006;12:515-20.
- <sup>13</sup> Karin M, Smeal T. *Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end*. Trends Biochem Sci 1992;17: 418-22.
- <sup>14</sup> May MJ, Ghosh S. *Signal transduction through NF- $\kappa$ B*. Immunol Today 1998;19:80-8.



- <sup>15</sup> Demoly P, Basset-Seguin N, Chanez P, et al. *C-fos proto-oncogene expression in bronchial biopsies of asthmatics*. Am J Respir Cell Mol Biol 1992;7:128-33.
- <sup>16</sup> Shibasaki F, Price ER, Milan D, et al. *Role of kinases and phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4*. Nature 1996;382:370-3.
- <sup>17</sup> Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, et al. *Signalling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs*. Trends Biochem Sci 1994;19:222-7.
- <sup>18</sup> Sampath D, Castro M, Look DC, et al. *Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma*. J Clin Invest 1999;103:1353-61.
- <sup>19</sup> Roth M, Johnson PRA, Borger P, et al. *Dysfunctional interaction of C/EBP $\alpha$  and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells*. N Engl J Med 2004;351:560-74.
- <sup>20</sup> Wagelie-Steffen AL, Kavanaugh AF, Wasserman SI. *Biologic therapies for the treatment of asthma*. Clin Chest Med 2006;27:133-47.

## INIBITORI DELLE MOLECOLE DI ADESIONE

**Cecilia Calabrese**

*Dipartimento di Scienze Cardiotoraciche e Malattie dell'Apparato Respiratorio,  
Seconda Università di Napoli*

### Introduzione

La flogosi delle vie aeree rappresenta il substrato patogenetico di numerose malattie respiratorie quali l'asma bronchiale e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).

Il reclutamento dei leucociti dal sangue nei tessuti rappresenta uno degli eventi più precoci nello sviluppo del processo infiammatorio e coinvolge, schematicamente, quattro stadi successivi:

- collisione e rotolamento (*rolling*) del leucocita sull'endotelio;
- attivazione delle molecole di adesione leucocitarie (integrine);
- adesione stabile e ferma del leucocita ai rispettivi ligandi sull'endotelio;
- migrazione trans-endoteliale.

Nel processo di reclutamento cellulare, le molecole di adesione, espresse sia dall'endotelio che dai leucociti, giocano un ruolo patogenetico cardine. Pertanto, esse possono rappresentare un importante target nella terapia dell'asma e della BPCO.

### Molecole di adesione

Le molecole di adesione appartengono ad una superfamiglia di proteine di membrana, suddivise in quattro sottoclassi in base alle loro caratteristiche strutturali: selectine, integrine, immunoglobuline e carboidrati <sup>1</sup>.

Esse mediano l'interazione leucocita/endotelio tramite il riconoscimento specifico tra la molecola di adesione ed il proprio recettore.

### Selectine

La famiglia delle selectine è rappresentata da tre proteine denominate, in base alla loro iniziale localizzazione cellulare, E-selectina (endoteliale), P-selectina (piastrinica), L-selectina (leucocitaria). Esse presentano una comune struttura molecolare caratterizzata da: un dominio amino-terminale tipo C-lectina, un dominio tipo fattore di crescita epiteliale (EGF), una serie di domini simili alle proteine che legano il complemento, un dominio trans-membranario ed una breve sequenza citoplasmatica.

Le selectine possono essere espresse sia costitutivamente che indotte da vari stimoli. Esse sono implicate nelle fasi iniziali del processo di reclutamento cellulare medianando il *rolling* delle cellule leucocitarie lungo l'endotelio vascolare <sup>1</sup>.

**P-selectina (CD62)** è una glicoproteina preformata, immagazzinata nei granuli alfa delle piastrine e nei corpuscoli di Weibel-Palade delle cellule endoteliali. In risposta a stimoli attivanti quali istamina, trombina, PAF e fattori del complemento, è rapidamente trasportata sulla superficie delle cellule endoteliali ove raggiunge il picco di espressione in

5-10 minuti. Essa promuove il rapido inizio dell'adesione dell'endotelio alle cellule leucocitarie e piastriniche.

**E-selectina** (ELAM-1) è espressa solo dalle cellule endoteliali attivate. È indotta da stimoli infiammatori come TNF- $\alpha$ , IL-1 e lipopolisaccaride, raggiunge il picco di massima espressione dopo 4-6 ore dalla stimolazione, declinando in circa 24-48 ore. È riconosciuta essenzialmente dai polimorfonucleati, monociti e linfociti T della memoria.

**L-selectina** (LECAM-1) è espressa costitutivamente sulla superficie dei leucociti e media le fasi iniziali dell'adesione dei granulociti all'endotelio. In seguito all'adesione dei leucociti all'endotelio o all'attivazione cellulare, L-selectina si distacca dalla superficie dei leucociti <sup>2</sup>.

I **ligandi delle E- e P-selectine** sono i determinanti antigenici tipo **sialil-Lewis<sup>x</sup>** o **sialil-Lewis<sup>a</sup>** presenti sulle glicoproteine espresse dalla superficie cellulare dei leucociti. Più recentemente sono stati identificati altri ligandi quali **PSGL-1** (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), in grado di legare E-, P- e L-selectine, ed **ESL-1** (*E-selectin ligand-1*), individuato sulla superficie cellulare dei leucociti murini, specifico per le E-selectine <sup>3-6</sup>.

I **ligandi delle L-selectine** sono le molecole CD34 e MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecole-1*) <sup>7 8</sup>.

### **Antagonisti delle selectine**

Le molecole di adesione del gruppo delle selectine mediano la fase iniziale del processo di reclutamento cellulare, il *rolling*, in cui i leucociti circolanti si legano reversibilmente all'endotelio e "rotolano" lungo la parete del vaso ematico. Pertanto, l'inibizione di specifiche selectine può svolgere un ruolo importante nel controllo del processo flogistico delle vie aeree nell'asma e nella BPCO.

### **Asma bronchiale**

#### **Modelli animali**

Nelle scimmie, la somministrazione di un

anticorpo monoclonale anti E-selectine ha inibito, in maniera significativa, la fase tardiva della risposta infiammatoria allergica ed ha ridotto il numero di granulociti neutrofili nel lavaggio broncoalveolare (BAL) <sup>9</sup>.

In un modello di asma allergico ovino il pretrattamento con anticorpi monoclonali anti L-selectine ha inibito la fase precoce e tardiva della risposta infiammatoria e lo sviluppo dell'iperreattività delle vie aeree <sup>10</sup>.

In modelli murini geneticamente carenti in P-selectine è stata dimostrata una riduzione della condizione di iperreattività specifica delle vie aeree <sup>11</sup>.

Bimosiamose (TBC1269), una molecola prodotta dalla Revotar Biopharmaceuticals AG, presenta una struttura simil-sialyl Lewis<sup>x</sup> ed è un'antagonista delle selectine. Essa è in grado di inibire *in vitro* in modo aspecifico tutte le selectine. Il composto si è dimostrato efficace in differenti modelli animali di asma allergico ove il pretrattamento con bimosiamose per via aerosolica o endovenosa ha determinato una riduzione della risposta infiammatoria precoce, probabilmente inibendo il rilascio di istamina dalle mast-cellule, ed una inibizione della fase tardiva e dell'iperreattività bronchiale riducendo il reclutamento dei neutrofili <sup>11</sup>.

#### **Trials clinici**

Nonostante la sintesi di numerose classi di inibitori delle selectine, l'unica molecola entrata in *trials* clinici per il trattamento dell'asma è Bimosiamose.

In un trial clinico di fase II, la somministrazione per via endovenosa di una dose unica di 30 mg/kg del farmaco in soggetti asmatici sottoposti a challenge allergenico ha determinato una riduzione significativa del numero degli eosinofili reclutati nelle vie aeree <sup>12</sup>. Recentemente, in uno studio randomizzato, doppio-cieco, placebo-controllato condotto in pazienti affetti da asma bronchiale di grado lieve la somministrazione per via aereo-solica di bimosiamose ha determinato un'at-

tenuazione della risposta asmatica tardiva indotta dal challenge allergenico<sup>13</sup>.

### Broncopneumopatia cronica ostruttiva

Nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) i neutrofili svolgono un ruolo patogenetico cruciale e le molecole di adesione della classe delle selectine sono coinvolte nel reclutamento di queste cellule nel polmone. Studi *in vitro* hanno dimostrato che gli inibitori di tali molecole di adesione sono efficaci nel prevenire tale fenomeno ed un'aumentata espressione del ligando PSGL-1 è stata dimostrata sui leucociti prelevati dal sangue periferico di pazienti affetti da BPCO.

È, pertanto, auspicabile che nuovi protocolli clinici siano prodotti al fine di valutare l'efficacia di molecole quali bimosiamose nel controllo e nella progressione del processo infiammatorio nella BPCO.

### Conseguenze dell'inibizione delle selectine

L'immunosoppressione è uno dei potenziali effetti collaterali indotti dall'inibizione delle selectine.

In una rara sindrome conosciuta come LAD II (*leukocyte adhesion deficiency type II*), caratterizzata da un difetto del metabolismo del fucosio che esita in una ridotta sintesi di ligandi per le selectine, i pazienti presentano infezioni opportunistiche frequenti<sup>14</sup>.

Analoghe conseguenze sono state dimostrate in modelli murini nei quali è stata indotta una delezione dei geni delle selectine<sup>15</sup>.

## Integrine

Le integrine sono una famiglia di eterodimeri costituiti dall'associazione di catene  $\alpha$  (pesanti) e  $\beta$  (leggere) legate non covalentemente espressi sulla superficie cellulare dei leucociti.

Le integrine sono suddivise in sottofamiglie ognuna delle quali ha una comune subunità  $\beta$  che si associa con differenti catene  $\alpha$ . Sono state individuate circa 30 integrine, ma solo

alcuni membri della sottofamiglia delle integrine  $\beta_1$  e  $\beta_2$  intervengono nei fenomeni di reclutamento cellulare<sup>16</sup>.

### $\beta_1$ integrine

Le integrine della sottofamiglia  $\beta_1$ , denominata anche VLA (*very late antigen*), sono coinvolte, principalmente, nell'adesione dei leucociti ai componenti della matrice extracellulare (collagene, laminina, fibronectina, etc.). Solo alcuni membri di questa famiglia sono implicati nei fenomeni di reclutamento cellulare come l'integrina  $\alpha 4 \beta 1$  (VLA-4), espressa sulla superficie cellulare dei linfociti, eosinofili, monociti, basofili e mast-cellule ma non dei neutrofili. L'espressione differenziale della molecola di adesione da parte degli eosinofili e neutrofili potrebbe essere implicata nella patogenesi del reclutamento selettivo degli eosinofili nelle vie aeree di asmatici. Tuttavia, nei ratti questa molecola di adesione è stata identificata sui neutrofili nei siti infiammatori<sup>17</sup>. VLA-4 rappresenta il principale ligando di VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecole-1*) espresso sulle cellule endoteliali attivate. Anche altre integrine sono in grado di interagire con VCAM-1 come  $\alpha 4 \beta 7$ , espressa dai linfociti T e B e dagli eosinofili,  $\alpha 9 \beta 1$ , espressa dai neutrofili circolanti ed  $\alpha d \beta 2$  espressa prevalentemente dagli eosinofili<sup>18 19</sup>.  $\alpha 4 \beta 7$  inoltre lega la molecola di adesione MAdCAM-1 ed è implicata nel "homing" dei linfociti nel tessuto linfoide<sup>20</sup>.

### $\beta_2$ integrine

Alla sottofamiglia delle  $\beta_2$  integrine, conosciuta anche come *Leukocyte cell adhesion molecules* (LEU-CAMs), appartengono le molecole  $\alpha L \beta 2$  (LFA-1; CD11a/CD18),  $\alpha M \beta 2$  (Mac-1; CD11b/CD18) e  $\alpha X \beta 2$  (CD11c/CD18). LFA-1 è espressa sulla superficie di tutte le sottopopolazioni leucocitarie. Mac-1 è espressa prevalentemente sulle cellule della linea mieloide. Entrambe legano le immunoglobuline ICAM-1 (*Inter-*

*cellular adhesion molecule-1*) ed ICAM-2 e sono responsabili dell'adesione e della migrazione delle cellule infiammatorie <sup>21</sup>.

Le interazioni tra VLA-4,  $\alpha 4\beta 7$  e  $\alpha d\beta 2$  con VCAM-1 e quelle tra LFA-1 ed ICAM-1 sembrano suggerire la compartecipazione di tali molecole alla fase iniziale del processo di reclutamento cellulare (*rolling*), che si verifica quando vi è ancora un flusso ematico fisiologico ed i recettori sono in una condizione di bassa affinità recettoriale. La successiva stimolazione da parte delle chemochine determina la transizione dei recettori verso uno stato di alta affinità. In particolare l'attivazione leucocitaria determina una modificazione conformazionale della molecola LFA-1 con conseguente aumento dell'avidità di legame per ICAM-1. È durante questa fase che si verifica l'adesione stabile dei leucociti all'endotelio <sup>22 23</sup>.

## Antagonisti dell'integrina *very late antigen-4*

### Asma bronchiale

#### *Modelli animali*

L'integrina *very late antigen-4* (VLA-4) è stata il target farmacologico di numerosi studi condotti in modelli animali di asma <sup>24</sup>.

Anticorpi monoclonali diretti contro la catena  $\alpha 4$  delle integrine sono stati somministrati in ratti, conigli, pecore, topi e maiali. Questi hanno determinato l'inibizione del reclutamento degli eosinofili nelle vie aeree e della condizione di iperresponsività indotta dalla stimolazione con allergene <sup>25</sup>.

Nelle pecore, la somministrazione di Bio-1211, una piccola molecola antagonista di VLA-4, ha determinato una riduzione del numero di cellule infiammatorie nel BAL e nelle biopsie bronchiali, l'inibizione delle risposte precoci e la abolizione delle risposte tardive e della iperresponsività delle vie aeree. Questi risultati hanno suggerito che gli

antagonisti di VLA-4 possono essere utilizzati non solo a scopo profilattico, ma anche terapeutico nell'asma <sup>26</sup>.

Gli studi successivi hanno valutato gli effetti degli antagonisti di VLA-4 in relazione alla loro via di somministrazione. In un modello murino è stato osservato che la somministrazione per via endovenosa elimina l'eosinofilia ma non ha effetto sulla iperresponsività delle vie aeree, mentre la somministrazione endonasale blocca sia l'infiammazione che la iperresponsività.

#### *Trials clinici*

La validità di VLA-4 come target terapeutico nell'uomo è stata confermata in un recente studio clinico in cui natalizumab, un anticorpo monoclonale anti-integrina  $\alpha 4$ , è stato utilizzato nella terapia della sclerosi multipla e del morbo di Crohn <sup>27-29</sup>; il suo impiego nelle patologie respiratorie non è stato ancora valutato.

Contemporaneamente allo sviluppo di natalizumab, diverse compagnie farmaceutiche hanno intrapreso sperimentazioni cliniche con diversi antagonisti di VLA-4.

La Merck/Biogen collaboration ha condotto il primo trial clinico nell'asma con una piccola molecola antagonista di VLA-4, Bio-1211, ma lo studio è stato interrotto in fase II per mancanza di efficacia del farmaco.

La molecola 1031 (Aventis), analoga della precedente, è stata inserita in uno studio di fase II per il trattamento dell'asma. È stata somministrata per via inalatoria, ma non sono ancora noti i risultati dello studio.

Notevole interesse ha suscitato il composto IVL-745, che è stato testato in uno studio randomizzato placebo-controllato in 16 pazienti affetti da asma di grado lieve e moderato sottoposti a challenge allergenico. Il farmaco non ha determinato differenze significative nell'entità delle risposte di fase precoce e tardiva indotte dal challenge allergenico, ma ha ridotto, in maniera significativa, il numero di eosinofili nell'espettorato indotto <sup>30</sup>.

La Roche sta conducendo uno studio di fase II con una molecola, R-411, antagonista  $\alpha 4\beta 1$ - $\alpha 4\beta 7$ , somministrata per via orale <sup>31</sup>.

La GlaxoSmithKline (GSK) sta testando la molecola GW-559090, somministrata per via inalatoria in trial clinici su rinite allergica e asma. Alla dose utilizzata (3 mg in unica somministrazione) l'antagonista non sembra attenuare le risposte precoci e tardive delle vie aeree indotte dalla stimolazione allergica. Pertanto, è stato ipotizzato che VLA-4 non svolga un ruolo critico nella patogenesi dell'infiammazione e dell'iperattività nell'asma <sup>32</sup>. Tuttavia, la compagnia farmaceutica sta sviluppando un potente inibitore di  $\alpha 4\beta 1$  ed  $\alpha 4\beta 7$ , la molecola TR-14035, che, in modelli murini di asma allergico, ha dato risultati incoraggianti in quanto ha indotto la soppressione dell'ipersensibilità delle vie aeree ed ha ridotto il numero di eosinofili, neutrofilii, linfociti e macrofagi nel BAL <sup>33</sup>.

Tra le nuove prospettive farmacologiche sono da annoverare le molecole derivate dell'acido 4-(pirrolidinil)metossibenzoico, antagoniste di VLA-4 ed attive per via orale in modelli animali di asma, in attesa di essere valutate nell'uomo <sup>34</sup>.

### Broncopneumopatia cronica ostruttiva

L'aumentato dell'espressione dell'integrina Mac-1 sulla superficie cellulare dei neutrofilii in soggetti affetti da BPCO e la sua presenza anche su monociti e macrofagi fa ipotizzare che tale molecola di adesione possa rappresentare un importante target farmacologico nel trattamento della BPCO. Dati sperimentali al riguardo non sono, ancora, disponibili in letteratura.

## Immunoglobuline

A questa famiglia di molecole di adesione appartiene un'ampia varietà di glicoproteine di membrana implicate nei fenomeni di riconoscimento e presentazione antigenica e

nelle interazioni leucociti-epitelio e leucociti-endotelio <sup>35</sup>.

Le molecole che partecipano al processo di reclutamento cellulare sono ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1.

**ICAM-1** (*intercellular adhesion molecule-1*) è espressa costitutivamente, a bassi livelli, sulle cellule endoteliali e su altri tipi cellulari. L'espressione di questa glicoproteina, sull'endotelio, è stimolata da fattori quali LPS, IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  che ne aumentano la trascrizione genica e la sintesi proteica. L'espressione di ICAM-1 è rilevabile dopo 2-4 ore, raggiunge il picco a 12 ore con un plateau che persiste fino a 24-72 ore. ICAM-1 è espressa costitutivamente anche sulle cellule dell'epitelio bronchiale e la sua espressione è aumentata da IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e, soprattutto, IFN- $\gamma$ . ICAM-1 possiede due differenti siti di legame per LFA-1 e Mac-1, integrine espresse dalle cellule leucocitarie.

**ICAM-2** (*intercellular adhesion molecule-2*) è espressa sulla superficie delle cellule endoteliali, ma non risente della regolazione da parte delle citochine.

**VCAM-1** (*vascular cell adhesion molecule-1*) è indotta sulla superficie delle cellule endoteliali da stimoli quali IL-1, TNF- $\alpha$ , LPS e, soprattutto, IL-4. La sua espressione aumenta dopo 2 ore dalla stimolazione e persiste per 72 ore. Il principale ligando di VCAM-1 è rappresentato dall'integrina VLA-4.

**PECAM-1** (*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 o CD31*) è una glicoproteina espressa dalle cellule endoteliali ove si localizza nelle sedi di giunzione tra le cellule <sup>36</sup>. È espressa, inoltre, da piastrine, monociti, neutrofilii e linfociti T. Essa interagisce con altre PECAM-1 e si ritiene che sia implicata nella fase di migrazione delle cellule leucocitarie. Funzionalmente simili al CD31 sono svolte dalle molecole JAM1, JAM2 e JAM3 (*junctional adhesion molecules*), capaci di legare le integrine  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$  <sup>37-40</sup>.

Attualmente non sono presenti in letteratura studi riguardanti l'uso di antagonisti delle molecole di adesione appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline nell'asma e nella BPCO.

### Bibliografia

- 1 Tedder TF, Steeber DA, Chen A, et al. *The selectins: vascular adhesion molecules*. FASEB J 1995;9:866-73.
- 2 Kleansas GS. *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood 1996;88:3259-87.
- 3 Wilkins PP, Moore KL, McEver RP, et al. *Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin*. J Biol Chem 1995;270:22677-80.
- 4 Goetz DJ, Greif DM, Ding H, et al. *Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin*. J Cell Biol 1997;137:509-19.
- 5 Tu L, Chen A, Delahunty MD, et al. *L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes: interactions between the lectin, epidermal growth factor and consensus repeat domains of the selectins determine ligand binding specificity*. J Immunol 1996;157:3995-4004.
- 6 Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, et al. *The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor*. Nature 1995;373:615-20.
- 7 Baumheter S, Singer MS, Hensel W, et al. *Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34*. Science 1993;262:436-8.
- 8 Berg EL, McEvoy LM, et al. *L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1*. Nature 1993;366:695-8.
- 9 Gundel RH, Wegner CD, Torcellini CA, et al. *Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 mediates antigen-induced acute airway inflammation and late-phase airway obstruction in monkeys*. J Clin Invest 1991;88:1407-11.
- 10 Abraham WM, Ahmed A, Sabater JR, et al. *Selectin blockade prevents antigen-induced late bronchial responses and airway hyperresponsiveness in allergic sheep*. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:1205-14.
- 11 DeSanctis GT, Wolyniec WW, Green FH, et al. *Reduction of allergic airway responses in P-selectin-deficient mice*. J Appl Physiol 1997;83:681-7.
- 12 Vanderslice P, Biediger RJ, Woodside DG, et al. *Development of cell adhesion molecule antagonists as therapeutics for asthma and BPCO*. Pulm Pharmacol Ther. 2004;17:1-10.
- 13 Beeh KM, Beier J, Meyer M, et al. *Bimosiamose, an inhaled small-molecule pan-selectin antagonist, attenuates late asthmatic reactions following allergen challenge in mild asthmatics: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical cross-over-trial*. Pulm Pharmacol Ther 2006;19:233-41.
- 14 Becker DJ, Lowe JB. *Leukocyte adhesion deficiency type II*. Biochim Biophys Acta 1999;1455:193-204.
- 15 Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, et al. *Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice*. J Exp Med 1996;183:2329-36.
- 16 Allavena P, Sozzani S. *Le basi molecolari del reclutamento leucocitario dal sangue ai tessuti*. In: Grandangolo: Immunologia e immunopatologia. Forum Service Editore 1997.
- 17 Issekutz TB, Miyasaka M, Issekutz AC. *Rat blood neutrophils express very late antigen 4 and it mediates migration to arthritic joint and dermal inflammation*. J Exp Med 1996;183:2175-84.
- 18 Taooka Y, Chen J, Yednock T, et al. *The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1*. J Cell Biol 1999;145:413-20.
- 19 Grayson MH, Van der Vieren M, Sterbinsky SA, et al. *Alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)*. J Exp Med 1998;188:2187-91.
- 20 Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, et al.  *$\alpha 4\beta 7$  integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1*. Cell 1993;74:85.
- 21 Xie J, Li R, Kotovuori P, et al. *Intercellular adhesion molecule-2 (CD102 binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain*. J Immunol 1995;155:3619-28.
- 22 Salas A, Shimaoka M, Chen S, et al. *Transition from rolling to firm adhesion is regulated by the*

- conformation of the I domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* 2002;277:50255-62
- 23 Constantin G, Majeed M, Giagulli C, et al. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 2000;13:759-69.
- 24 Vanderslice P, Biediger RJ, Woodside DG, et al. Development of cell adhesion molecule antagonists as therapeutics for asthma and BPCO. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2004;17:1-10.
- 25 Gascoigne MH, Holland K, Page CP, et al. The effect of anti-integrin monoclonal antibodies on antigen-induced pulmonary inflammation in allergic rabbits. *Pulm Pharmacol Ther* 2003;16:279-85.
- 26 Bolger GT. *BIO-1211 (Biogen)*. *IDrugs* 2000;3:536-40.
- 27 Hyams JS, Wilson DC, Thomas A, et al; International Natalizumab CD305 Trial Group. Natalizumab therapy for moderate to severe Crohn disease in adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:185-91.
- 28 MacDonald JK, McDonald JW. Natalizumab for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD006097. Review.
- 29 O'Connor P. Natalizumab and the role of alpha 4-integrin antagonism in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther* 2007;7:123-36.
- 30 Norris V, Choong L, Tran D, et al. Effect of IVL745, a VLA-4 antagonist, on allergen-induced bronchoconstriction in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:761-7.
- 31 Hijazi Y, Welker H, Dorr AE, et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of R411, a dual alpha4beta1-alpha4beta7 integrin antagonist after oral administration at single and multiple once-daily ascending doses in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2004;44:1368-78.
- 32 Ravensberg AJ, Liujk B, Westers P, et al. The effect of a single inhaled dose of a VLA-4 antagonist on allergen-induced airway responses and airway inflammation in patients with asthma. *Allergy* 2006;61:1097-103.
- 33 Cortijo J, Sanz MJ, Iranzo A, et al. A small molecule, orally active, alpha4beta1/alpha4beta7 dual antagonist reduces leukocyte infiltration and airway hyper-responsiveness in an experimental model of allergic asthma in brown Norway rats. *Brit Journal Pharmacol* 2006;147:661-70.
- 34 Chiba J, Iimura S, Yoneda Y, et al. 4-(Pyrrolidiny)methoxybenzoic Acid derivatives as a potent, orally active VLA-4 antagonist. *Chem Pharm Bull* 2006;54:1515-29.
- 35 Mazzarella G, Calabrese C, Mezzogiorno A, et al. Immunoflogosi nell'asma bronchiale. *Meccanismi di reclutamento ed interazioni cellulari*. *Caleidoscopio italiano* 1995;44-52.
- 36 Sun QH, DeLisser HM, Zukowski MM, et al. Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity. *J Biol Chem* 1996;271:11090-8.
- 37 Chavakis T, Preissner KT, Santoso S. Leukocyte trans-endothelial migration: JAMs add new pieces to the puzzle. *Thromb Haemost* 2003;89:13-7.
- 38 Cunningham SA, Rodriguez JM, Arrate MP, et al. JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3. *J Biol Chem* 2002;277:27589-92.
- 39 Ostermann G, Weber KS, Zemecke A, et al. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* 2002;3:151-8.
- 40 Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, et al. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med* 2002;196:679-91.





## INIBITORI DEI FATTORI DI CRESCITA

Cecilia Calabrese

*Dipartimento di Scienze Cardiotoraciche e Malattie dell'Apparato Respiratorio,  
Seconda Università di Napoli*

### Introduzione

I fattori di crescita sono proteine che stimolano la proliferazione e il differenziamento cellulare attraverso il controllo esterno del ciclo cellulare. I fattori di crescita sono raggruppati in famiglie di proteine strutturalmente simili quali la famiglia del TGF- $\beta$  (*transforming growth factor* – fattore di crescita trasformante), BMP (proteina morfogenetica dell'osso), neurotrofine (NGF, BDNF, e NT3), FGF (fattore di crescita dei fibroblasti), etc.

I fattori di crescita svolgono un ruolo patogenetico chiave nei processi di rimodellamento strutturale associati alle malattie infiammatorie croniche delle vie aeree quali l'asma e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). Nell'asma bronchiale tali fenomeni sono stati ampiamente studiati e consistono nell'ispessimento della membrana basale subepiteliale, ipertrofia ed iperplasia delle cellule muscolari lisce e delle ghiandole sottomucose, desquamazione epiteliale, iperplasia delle goblet cell ed aumento della vascolarità delle vie aeree. Nella BPCO le alterazioni strutturali interessano sia le vie aeree che il parenchima polmonare. A livello delle diramazioni bronchiali più periferiche l'ipertrofia e l'iperplasia dell'apparato muco-secerne e della muscolatura liscia si associano a fenomeni di fibrosi della pa-

rete delle vie aeree. A livello del parenchima polmonare lo squilibrio del sistema proteasi/anti-proteasi determina fenomeni di alterato turnover della matrice extracellulare con conseguente distruzione del tessuto elastico e sviluppo di enfisema.

Le attuali terapie dell'asma sono in grado di controllare la patologia nella maggioranza dei casi. I farmaci disponibili, tuttavia, non interferiscono in maniera efficace sul processo di rimodellamento strutturale e, pertanto, circa il 20% delle forme più severe della patologia sfugge dal controllo farmacologico. Come è noto, un complesso network di fattori di crescita è implicato nella patogenesi del rimodellamento delle vie aeree ed il ripristino di un equilibrio tra fattori di crescita pro ed anti-fibrogenici, mediante ad esempio l'uso di anticorpi neutralizzanti, potrebbe essere un utile target terapeutico dell'asma. Ciò assume una importanza ancora maggiore nella BPCO ove i farmaci impiegati, mutuati dalla terapia dell'asma, non sono in grado né di controllare la patologia né di rallentare in maniera significativa il progressivo deterioramento funzionale osservato in questi pazienti.

L'alterata regolazione dei fenomeni proliferativi cellulari nell'asma e nella BPCO ha, comunque, un impatto sostanzialmente meno rilevante rispetto ad altre condizioni morbose quali fibrosi polmonare idiopatica e

neoplasie polmonari e, pertanto, l'attenzione rivolta dalla ricerca farmacologica in questo campo è alquanto limitata. Al momento non esistono *trials* clinici con inibitori dei fattori di crescita nell'asma e nella BPCO. In letteratura sono presenti solo studi effettuati in modelli animali di asma il cui obiettivo principale è stato la comprensione del ruolo svolto dai singoli fattori di crescita nella patogenesi della malattia.

Nel presente capitolo verranno trattate, schematicamente, le più recenti acquisizioni riguardanti il ruolo dei principali fattori di crescita nella patogenesi dell'asma e della BPCO e, ove disponibili, riporteremo i risultati provenienti da studi sperimentali condotti con inibitori dei fattori di crescita. Tali farmaci possono operare a diversi livelli come inibitori della sintesi, anticorpi monoclonali rivolti verso il fattore di crescita, inibitori delle chinasi del recettore e delle vie di segnalazione intracellulari. Queste ultime sono oggetto di uno specifico capitolo.

## Inibitori del transforming growth factor- $\beta$

I *transforming growth factors* (TGFs)- $\beta$  costituiscono una famiglia di citochine coinvolte nella regolazione della crescita, sviluppo e differenziazione cellulare. Sono state descritte almeno 30 isoforme di questa citochina ma nei mammiferi sono state identificate 3 isoforme: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Si tratta di proteine omodimeriche di 25 kD, composte da 112 aminoacidi i cui geni sono localizzati rispettivamente nei cromosomi 19q13, 1q41 e 14q24. TGF- $\beta$  è immesso in circolo in una forma biologicamente inattiva detta "latente", dovuta al legame della porzione N-terminale della molecola con il dimero B1-LAP (*latency associated peptide*). La forma latente ha una emivita maggiore (circa 90 minuti) della forma attiva (2-3 mi-

nuti) e può costituire una fonte di TGF- $\beta$  attivabile in loco.

Il TGF- $\beta$  possiede tre recettori trans-membrana: TGF- $\beta$  RI, TGF- $\beta$  RII e TGF- $\beta$  RIII. I primi due sono serina/treonina chinasi e svolgono un ruolo fondamentale nella trasmissione del segnale attivato da TGF- $\beta$ , il recettore tipo III è un betaglicano di cui non sono note le proprietà enzimatiche. Il TGF- $\beta$  si lega al TGF- $\beta$  RII, direttamente o attraverso TGF- $\beta$  RIII che favorisce il legame di TGF- $\beta$  RII con il recettore tipo I. TGF- $\beta$  RII, quindi, fosforila ed attiva TGF- $\beta$  RI, il quale, a sua volta, fosforila Smad2 o Smad3. Questi, fosforilati, si associano con Smad4 e si spostano nel nucleo dove attivano la trascrizione genica.

Il TGF- $\beta$  svolge un ruolo patogenetico chiave nel processo di rimodellamento strutturale che si verifica nell'asma. Alcuni studi documentano un'aumentata immunoreattività per TGF- $\beta$  nelle vie aeree di pazienti asmatici<sup>1</sup> ed i livelli della citochina nel BAL aumentano dopo challenge con l'allergene<sup>2</sup>. La fonte principale di TGF- $\beta$  nell'asma è rappresentata dalle cellule epiteliali bronchiali che, danneggiate ed attivate, producono quantità aumentate di TGF- $\beta$  che induce la proliferazione e la differenziazione dei fibroblasti in miofibroblasti<sup>3</sup>. Quest'ultimi, attivati, producono componenti della matrice extracellulare responsabili dell'ispessimento della lamina reticolare della membrana basale. I miofibroblasti, inoltre, secernono fattori di crescita, chemochine e citochine che promuovono la proliferazione delle cellule muscolari lisce delle vie aeree, l'aumento della permeabilità vascolare e della rete neurale. Nell'asma il TGF- $\beta$  è secreto anche da altri tipi cellulari quali eosinofili, macrofagi, miofibroblasti e cellule muscolari lisce. Sebbene TGF- $\beta$  possieda proprietà antinfiammatorie è stato ipotizzato che l'eccessiva produzione della citochina nell'asma possa inibire la proliferazione delle cellule epiteliali, compromettendo la riparazione e perpetuando così il danno della barriera epiteliale<sup>4</sup>.

Con riferimento agli studi sperimentali effettuati nell'asma i dati al momento riportati in letteratura riguardano l'attività di un inibitore della TGF- $\beta$  RI chinasi (SD-208) in un modello murino di asma. Questo composto inibiva l'ipereattività delle vie aeree, lo stato infiammatorio ed il *remodeling* indotto dalla sensibilizzazione ed esposizione ad ovoalbumina<sup>5</sup>.

Anche nella BPCO il TGF- $\beta$  svolge un ruolo cruciale nella patogenesi del processo di rimodellamento strutturale. Nei pazienti affetti da BPCO un'aumentata espressione di TGF- $\beta$  è stata riscontrata nell'epitelio delle piccole vie aeree<sup>6</sup>. La citochina, inducendo il rilascio di CTGF (collagen tissue growth factor), è implicata nella patogenesi del processo fibrotico presente nella parete delle vie aeree periferiche<sup>7</sup>. La metalloproteasi (MMP)-9, mediante il clivaggio proteolitico della TGF- $\beta$ -binding protein-1 dalla forma latente della citochina, è in grado di attivare il TGF- $\beta$ <sup>8</sup>. Questo meccanismo potrebbe rappresentare il collegamento tra l'elastolisi indotta da MMP-9 e la simultanea fibrosi delle piccole vie aeree presente nella BPCO.

Studi eseguiti in linee cellulari umane hanno dimostrato che TGF- $\beta$  riduce l'espressione dei recettori  $\beta_2$ , mediante una inibizione della trascrizione genica<sup>9</sup>, e riduce la sensibilità ai  $\beta_2$ -agonisti nelle cellule muscolari lisce *in vitro*<sup>10</sup>.

L'inibizione del TGF- $\beta$  potrebbe essere, quindi, un'utile strategia terapeutica nella BPCO benché, al momento, non vi sono dati sperimentali al riguardo. Tuttavia, dati recenti ipotizzano che il TGF- $\beta$  possa avere anche un ruolo protettivo nella BPCO. Studi di genetica dimostrano che i polimorfismi del gene di TGF- $\beta_1$ , associati ad un'aumentata espressione del fattore di crescita, sono più frequenti tra i soggetti sani che tra i fumatori con BPCO<sup>11 12</sup>. Studi condotti su modelli animali e nell'uomo *in vivo* hanno dimostrato che una ridotta espressione di TGF- $\beta_1$  è implicata nella patogenesi dell'enfisema

mediante attivazione delle metalloproteasi o ridotta produzione di inibitori delle metalloproteasi<sup>13-15</sup>. Inoltre, uno studio recente ha dimostrato una diminuita espressione del recettore TGF- $\beta$  RII nelle ghiandole bronchiali di fumatori con BPCO. La riduzione dei segnali intracellulari attivati da TGF- $\beta_1$  può contribuire all'ipersecrezione di muco ed all'iperplasia delle ghiandole caratteristiche della bronchite cronica<sup>16</sup>.

### Inibitori dell'epidermal growth factor receptor

L'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) (ErbB1), un membro della famiglia ErbB, è espresso da vari tipi cellulari, tra cui fibroblasti e cellule epiteliali delle vie respiratorie. In queste ultime, i recettori ErbB sono espressi sulle superfici basolaterali delle cellule basali e vengono esposti, quindi, in seguito al danno dell'epitelio. Nei mammiferi, i ligandi per EGFR comprendono EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*). Tali ligandi sono sintetizzati da un ampio numero di cellule sebbene ognuno abbia una propria distribuzione cellulare preferenziale. Per esempio, TGF $\alpha$  è espressa soprattutto da cellule epiteliali, macrofagi ed eosinofili, mentre EGF soprattutto dalle ghiandole ed, in minor misura, dalle cellule epiteliali e muscolari lisce. L'attivazione di EGFR da parte dei vari ligandi induce fenomeni di migrazione, proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulare.

Nell'asma è stata documentata un'aumentata espressione dei ligandi per EGFR e del recettore stesso. Un aumento dell'immunoattività per EGF è presente nell'epitelio bronchiale, ghiandole e muscolatura liscia<sup>17</sup>. Inoltre, le cellule epiteliali di asmatici, in risposta a citochine pro-infiammatorie, quali TNF- $\alpha$  e la combinazione di IL-4, IL-13 ed allergene, producono quantità maggiori di TGF- $\alpha$ <sup>18</sup>. L'espressione di EGFR è aumen-

tata nelle cellule epiteliali circostanti la sede del danno ed in corrispondenza della superficie apicale delle cellule basali esposte<sup>19</sup> e correla con la severità della malattia<sup>20</sup>. Tuttavia nell'asma questa espressione aumentata di EGFR non è associata ad un'aumento della risposta proliferativa dell'epitelio<sup>21</sup>. È stato ipotizzato che l'alterato fenotipo delle cellule epiteliali nell'asma le rende incapaci di reagire al danno o allo stress con un appropriato meccanismo di riparazione mediato dai recettori EGFR. Ciò perpetua la produzione da parte delle cellule epiteliali di citochine e fattori di crescita pro-fibrotici implicati nella patogenesi del processo infiammatorio e del rimodellamento strutturale nell'asma<sup>22</sup>.

Il rilascio di ligandi per EGFR e l'aumentata espressione dello stesso recettore sono implicati nella patogenesi dell'ipersecrezione di muco da parte delle cellule epiteliali mediante l'aumento dell'espressione e trascrizione di geni per la mucina MUC5AC<sup>23</sup>. Nelle forme più severe di asma, l'attivazione di EGFR induce il rilascio della chemochina CXCL-8 (IL-8) che favorisce il reclutamento dei neutrofilo nelle vie aeree<sup>24</sup>. I neutrofilo, mediante il rilascio di ossidanti, possono contribuire alla patogenesi dell'ipersecrezione di muco.

Per quanto riguarda gli studi sperimentali nell'asma, l'effetto di un inibitore della tirosin chinasi associata all'EGFR, gefitinib, è stato valutato in topi sensibilizzati con ovalbumina. Il farmaco, in maniera dose-dipendente, riduceva il numero di cellule infiammatorie ed il rilascio delle citochine IL-4 ed IL-13 nel BAL, il reclutamento degli eosinofili nel polmone e l'ipereattività bronchiale<sup>25</sup>.

Nella BPCO l'attivazione di EGFR gioca un ruolo chiave nella patogenesi dell'ipersecrezione mucosa. Studi recenti dimostrano che stimoli quali il fumo di sigaretta<sup>26</sup>, specie reattive dell'ossigeno e metalloproteasi della matrice attivano l'enzima TACE (*TNF-alpha-converting enzyme*) che deter-

mina il clivaggio del pro-TGF- $\alpha$  nel TGF- $\alpha$ . Questa citochina, mediante l'attivazione di EGFR, determina un'aumentata produzione di muco. Inoltre il reclutamento dei neutrofilo nelle vie aeree, caratteristico della BPCO, può indurre ipersecrezione di muco mediante differenti meccanismi EGFR-mediati: (i) secrezione di tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , che induce l'espressione di EGFR da parte delle cellule epiteliali; (ii) rilascio di specie reattive dell'ossigeno che attivano EGFR; (iii) clivaggio di prolindanti di EGFR (pro-TGF- $\alpha$ ) da parte dell'elastasi neutrofila; (iv) degranolazione delle goblet cells indotta dall'elastasi neutrofila<sup>27</sup>.

Piccole molecole inibitrici della tirosin chinasi di EGFR, quali gefitinib, sono state sintetizzate e sono attualmente in uso nella terapia del carcinoma del polmone non a piccole cellule. Questa terapia è ben tollerata e potrebbe, quindi, essere applicata al trattamento dell'ipersecrezione mucosa nella BPCO.

## Inibitori del vascular endothelial growth factor

La *vascular endothelial growth factor* (VEGF) è uno dei più potenti mediatori coinvolto nei fenomeni di angiogenesi ed aumento della permeabilità vascolare. Sono stati identificati diversi membri della famiglia del VEGF (VEGF-A, -B, C, -D, -E e *placental growth factor* PLGF)<sup>5</sup>. La molecola più studiata è il VEGF-A comunemente indicata come VEGF. Il gene che codifica per il VEGF è localizzato sul cromosoma 6p21.3 ed è organizzato in otto esoni separati da sette introni. Dallo "splicing" alternativo degli esoni originano diverse isoforme di VEGF (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, e VEGF<sub>206</sub>), di cui VEGF<sub>165</sub> è la isoforma predominante. Il VEGF nativo è una glicoproteina basica omodimerica di 45 kDa.

Sono stati identificati tre recettori del VEGF che appartengono alla famiglia dei recettori

tirosin-chinasi: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 (KDR) e VEGFR-3 (Flt-4). VEGFR-1 e VEGFR-2, espressi da un'ampia varietà di cellule, hanno domini extracellulari tipo immunoglobulina ed un dominio transmembrana tirosin-chinasi. L'attivazione del VEGFR2 è coinvolta nei fenomeni di crescita ed aumento della permeabilità vascolare. VEGFR1 ha, probabilmente, la funzione di modulare l'attività di VEGFR2, inibendo il legame VEGFR2-VEGF. VEGFR-3 è espresso principalmente dall'endotelio dei vasi linfatici.

Il VEGF gioca un ruolo chiave nella patogenesi del rimodellamento vascolare presente nell'asma bronchiale. Un aumento dell'immunoreattività per il VEGF è stato documentato nell'espettorato indotto<sup>30</sup>, nel BAL<sup>31</sup> e nelle biopsie bronchiali<sup>32</sup> di pazienti asmatici. L'espressione del VEGF nei prelievi biotipici correla con la vascolarità delle vie aeree e questo dato suggerisce un ruolo patogenetico svolto dal VEGF nell'angiogenesi della rete vascolare nell'asma<sup>33</sup>. I livelli aumentati di VEGF nei pazienti asmatici correlano, inoltre, con il grado di ostruzione al flusso aereo, con l'entità dell'infiltrazione eosinofila e con un indice di permeabilità vascolare<sup>30, 33</sup>. È stato ipotizzato che l'aumento della permeabilità vascolare indotto dal VEGF possa contribuire alla patogenesi della broncoostruzione indotta dall'esercizio fisico negli asmatici<sup>34</sup>. Infine, il VEGF sembra implicato nella patogenesi dell'aumento dello spessore della membrana basale subepiteliale suggerendo, quindi, un suo ruolo nei fenomeni di rimodellamento strutturale nell'asma<sup>35</sup>.

Per quanto riguarda gli studi con inibitori del VEGF, al momento, esistono solo evidenze sperimentali provenienti da modelli animali di asma. In un modello murino sensibilizzato con ovalbumina, il pre-trattamento con endostatina, un potente fattore antiangiogenetico, inibiva lo sviluppo dell'iperresponsività delle vie aeree, dell'infiammazione polmo-

nare allergica e degli anticorpi IgE specifici per l'ovalbumina. Tali effetti erano mediati da meccanismi VEGF-dipendenti e VEGF-indipendenti; infatti la somministrazione di anticorpi bloccanti i recettori del VEGF riduceva l'infiammazione polmonare allergica ma non alterava l'iperattività delle vie aeree e la sintesi di IgE<sup>36</sup>. In ratti sensibilizzati ed esposti ad ovalbumina la somministrazione di inibitori dei recettori del VEGF riduceva il numero di cellule infiammatorie delle vie aeree, l'iperresponsività, la permeabilità vascolare e l'espressione della metalloproteasi-9 (MMP-9)<sup>37</sup>. In un modello murino di asma indotto da toluene diisocianato (TDI) la somministrazione di inibitori del recettore del VEGF attenuava tutte le manifestazioni fisiopatologiche indotte dal TDI quali l'iperattività e l'infiammazione delle vie aeree<sup>38</sup>.

Il ruolo del VEGF nella patogenesi della BPCO è più controverso. In un recente studio il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che nelle vie aeree centrali di soggetti fumatori affetti da bronchite cronica con e senza BPCO vi è un aumento della vascolarità rispetto a soggetti di controllo non fumatori. L'aumento del numero di vasi si associava ad un'aumentata espressione di VEGF da parte delle cellule infiammatorie<sup>39</sup>. Nei pazienti affetti da BPCO l'aumento dell'espressione del VEGF è stato documentato anche a livello dell'epitelio delle vie aeree più periferiche, degli alveoli, dei macrofagi e della muscolatura liscia delle vie aeree e dei vasi<sup>40</sup>. Anche l'espressione dei recettori del VEGF è aumentata nei pazienti affetti da BPCO<sup>40</sup>. Al contrario, studi *in vivo* ed *in vitro* dimostrano che la riduzione dei livelli di VEGF od il blocco dei recettori sono in grado di determinare enfisema<sup>41, 42</sup>. Queste differenze nella vascolarità delle vie aeree nelle BPCO con e senza enfisema sono riflesse dalle differenti concentrazioni di VEGF nell'espettorato indotto. Questo è aumentato nei pazienti affetti da bronchite cronica e diminuito nei

pazienti affetti da enfisema rispetto ai controlli sani. Le concentrazioni di VEGF nell'espettorato di bronchitici cronici correlano, in maniera negativa, con l'ostruzione al flusso aereo, espresso dal FEV<sub>1</sub>; al contrario, nei pazienti con enfisema, vi è una correlazione positiva tra VEGF nell'espettorato indotto, FEV<sub>1</sub>, e DLco<sup>43</sup>. Un altro studio ha evidenziato una correlazione inversa tra VEGF ed indici di stress ossidativo nella BPCO: con l'aumentare della severità della malattia si riducevano i livelli di VEGF ed aumentava lo stress ossidativo. È stato ipotizzato che il danno epiteliale mediato dallo stress ossidativo possa determinare una riduzione dei livelli di VEGF promuovendo lo sviluppo della BPCO<sup>44</sup>.

Il significato dell'espressione di VEGF nei pazienti con BPCO rimane controverso. L'aumento della vascolatura bronchiale nelle vie aeree potrebbe favorire il reclutamento di cellule infiammatorie e l'essudazione di mediatori, soprattutto se è alterata la permeabilità vascolare. Inoltre, determinando un aumento dello spessore della parete, VEGF potrebbe essere coinvolto nella patogenesi della broncostruzione e dell'ipereattività bronchiale. L'aumento dell'espressione di VEGF nelle vie aeree distali e negli alveoli potrebbe, al contrario, rappresentare un meccanismo protettivo nei confronti dello sviluppo di enfisema nei pazienti con BPCO. Nell'insieme questi studi suggeriscono che il VEGF esercita un ruolo dannoso a livello dell'albero bronchiale ed un effetto protettivo a livello degli alveoli.

## Inibitori del nerve growth factor

Il *nerve growth factor* (NGF) è un peptide ad alto peso molecolare che appartiene alla famiglia delle neurotrofine. È prodotto da numerose cellule strutturali ed infiammatorie ed attiva due tipi di recettori, il recettore TrkA (*tropomyosin-receptor kinase A*) ed il recettore p75<sup>NTR</sup>. NGF esercita un ruolo

cruciale nella crescita e sopravvivenza delle cellule nervose. Tuttavia, studi recenti dimostrano che NGF può partecipare alla patogenesi del processo infiammatorio, soprattutto nelle vie aeree. Studi condotti in animali da esperimento dimostrano che NGF può contribuire alla patogenesi dell'ipereattività bronchiale. Esso, inoltre, è in grado di indurre la migrazione e l'attivazione di cellule infiammatorie, che infiltrano la mucosa delle vie aeree, e di cellule strutturali, quali cellule epiteliali, muscolari lisce e fibroblasti. Questi effetti, in parte, sono mediati dall'attivazione del sistema delle tachichinine<sup>45</sup>. Un aumento dell'espressione e del rilascio di NGF è presente nei soggetti asmatici dopo provocazione bronchiale con allergene.

In cavie sensibilizzate ed esposte ad ovalbumina l'inibizione della trasduzione del segnale indotta dall'attivazione del recettore ad alta affinità del NGF mediante somministrazione di K252a o tyrphostin AG879, inibitori della tirosinasi A, riduceva l'ipereattività delle vie aeree e l'aumento della sostanza P nei gangli e nel tessuto polmonare anche se non modificava l'afflusso di cellule infiammatorie nel BAL<sup>46</sup>.

## Bibliografia

- 1 Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, et al. *Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:591-9.
- 2 Redington AE, Madden J, Frew AJ, et al. *Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid*. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:642-7.
- 3 Zhang S, Smartt H, Holgate ST, et al. *Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma*. Lab Invest 1999;79:395-405.
- 4 Boxall C, Holgate ST, Davies DE. *The contribution of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma*. Eur Respir J 2006;27:208-29.

- 5 Leung SY, Niimi A, Noble A, et al. *Effect of transforming growth factor-beta receptor I kinase inhibitor 2,4-disubstituted pteridine (SD-208) in chronic allergic airway inflammation and remodeling.* J Pharmacol Exp Ther 2006;319:586-94.
- 6 Takizawa H, Tanaka M, Takami K, et al. *Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (BPCO).* Am J Respir Crit Care Med 2001;163:1476-83.
- 7 Ihn H. *Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF.* Curr Opin Rheumatol 2002;14:681-5.
- 8 Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, et al. *Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix.* J Biol Chem 2002;277:21352-60.
- 9 Mak JC, Rousell J, Haddad EB, et al. *Transforming growth factor-beta1 inhibits beta2-adrenoceptor gene transcription.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2000;362:520-5.
- 10 Ishikawa T, Kume H, Kondo M, et al. *Inhibitory effects of interferon-gamma on the heterologous desensitization of beta-adrenoceptors by transforming growth factor-beta 1 in tracheal smooth muscle.* Clin Exp Allergy 2003;33:808-15.
- 11 Wu L, Chau J, Young RP, et al. *Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease.* Thorax 2004;59:126-9.
- 12 Celedon JC, Lange C, Raby BA, et al. *The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (BPCO).* Hum Mol Genet 2004;13:1649-56.
- 13 Sterner-Kock A, Thorey IS, Koli K, et al. *Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer.* Genes Dev 2002;16:2264-73.
- 14 Morris DG, Huang X, Kaminski N, et al. *Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema.* Nature 2003;422:169-73.
- 15 Pons AR, Sauleda J, Noguera A, et al. *Decreased macrophage release of TGF-beta and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J 2005;26:60-6.
- 16 Baraldo S, Bazzan E, Turato G, et al. *Decreased expression of TGF-beta type II receptor in bronchial glands of smokers with BPCO.* Thorax 2005;60:998-1002.
- 17 Amishima M, Munakata M, Nasuhara Y, et al. *Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway.* Am J Respir Crit Care Med 1998;157:1907-12.
- 18 Lordan JL, Bucchieri F, Richter A, et al. *Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells.* J Immunol 2002;169:407-14.
- 19 Polosa R, Prosperini G, Leir SH, et al. *Expression of c-erbB receptors and ligands in human bronchial mucosa.* Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:914-23.
- 20 Puddicombe SM, Polosa R, Richter A, et al. *Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma.* FASEB J 2000;14:1362-74.
- 21 Puddicombe SM, Torres-Lozano C, Richter A, et al. *Increased expression of p21(waf) cyclin-dependent kinase inhibitor in asthmatic bronchial epithelium.* Am J Respir Cell Mol Biol 2003;28:61-8.
- 22 Holgate ST. *Epithelial damage and response.* Clin Exp Allergy 2000;30:37-41.
- 23 Takeyama K, Fahy JV, Nadel JA. *Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi.* Am J Respir Crit Care Med 2001;163:511-6.
- 24 Hamilton LM, Torres-Lozano C, Puddicombe SM, et al. *The role of the epidermal growth factor receptor in sustaining neutrophil inflammation in severe asthma.* Clin Exp Allergy 2003;33:233-40.
- 25 Hur GY, Lee SY, Lee SH, et al. *Potential use of an anticancer drug gefinitib, an EGFR inhibitor, on allergic airway inflammation.* Exp Mol Med 2007;39:367-75.
- 26 Shao MX, Nakanaga T, Nadel JA. *Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 287:L420-7.
- 27 Kim S, Nadel JA. *Role of Neutrophils in Mucus Hypersecretion in BPCO and Implications*



- for therapy. *Treat Respir Med* 2004;3:147-59.
- 28 Salvato G. *Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects*. *Thorax* 2001;56:902-6.
- 29 Feltis BN, Wignarajah D, Zheng L, et al. *Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1201-7.
- 30 Asai K, Kanazawa H, Kamoi H, et al. *Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients*. *Clin Exp Allergy* 2003;33:595-9.
- 31 Feltis BN, Wignarajah D, Zheng L, et al. *Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1201-7.
- 32 Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA. *Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma*. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:1034-8.
- 33 Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. *Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis*. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:295-301.
- 34 Kanazawa H, Hirata K, Yoshikawa J. *Involvement of vascular endothelial growth factor in exercise induced bronchoconstriction in asthmatic patients*. *Thorax* 2002;57:885-8.
- 35 Chetta A, Zanini A, Foresi A, et al. *Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma*. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1437-42.
- 36 Suzaki Y, Hamada K, Sho M, et al. *A potent antiangiogenic factor, endostatin prevents the development of asthma in a murine model*. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1220-7.
- 37 Lee KS, Min KH, Kim SR, et al. *Vascular endothelial growth factor modulates matrix metalloproteinase-9 expression in asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:161-70.
- 38 Lee YC, Kwak YG, Song CH. *Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma*. *J Immunol* 2002;168:3595-600.
- 39 Calabrese C, Bocchino V, Vatrella A, et al. *Evidence of angiogenesis in bronchial biopsies of smokers with and without airway obstruction*. *Respir Med* 2006;100:1415-22.
- 40 Kranenburg AR, de Boer WI, Alagappan VK, et al. *Enhanced bronchial expression of vascular endothelial growth factor and receptors (Flk-1 and Flt-1) in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. *Thorax* 2005;60:106-13.
- 41 Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, et al. *Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema*. *J Clin Invest* 2000;106:1311-9.
- 42 Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, et al. *Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:737-44.
- 43 Kanazawa H, Asai K, Hirata K, et al. *Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Med* 2003;114:354-8.
- 44 Kanazawa H, Yoshikawa J. *Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of BPCO*. *Chest* 2005;128:3191-7.
- 45 Quarcoo D, Schulte-Herbruggen O, Lommatzsch M, et al. *Nerve growth factor induces increased airway inflammation via a neuropeptide-dependent mechanism in a transgenic animal model of allergic airway inflammation*. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1146-51.
- 46 de Vries A, Engels F, Henricks PA, et al. *Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: a potential role for trkA*. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1192-200.

## INIBITORI DELLE CITOCHINE E CHEMOCHINE

Alessandro Vatrella

*Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Napoli "Federico II"*

### Introduzione

Le citochine sono un gruppo eterogeneo di molecole in grado di modulare numerosi processi biologici. Esse, di fatto, costituiscono il linguaggio molecolare che permette la comunicazione tra le diverse cellule del sistema immunitario e tra queste e altri sistemi.

A livello delle vie aeree, le citochine vengono prodotte da cellule infiammatorie (linfociti, eosinofili, neutrofilo, etc.) e da cellule strutturali (epitelio, endotelio, muscolatura liscia e fibroblasti).

Le citochine giocano un ruolo chiave nell'induzione, nell'amplificazione e nel mantenimento dei processi infiammatori che caratterizzano le vie aeree in tutte le patologie respiratorie, comprese l'asma e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). Tuttavia, non tutte le citochine sono proinfiammatorie. Infatti, alcune molecole, quali interleuchina (IL)-10, IL-12 ed interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) possono attenuare o prevenire l'infiammazione delle vie aeree.

Il coinvolgimento di numerose citochine nella patogenesi dell'infiammazione cronica e del rimodellamento strutturale delle vie aeree che caratterizzano l'asma è stato particolarmente studiato e in gran parte delineato. Risulta, invece, meno definito il ruolo delle citochine nella patogenesi della BPCO.

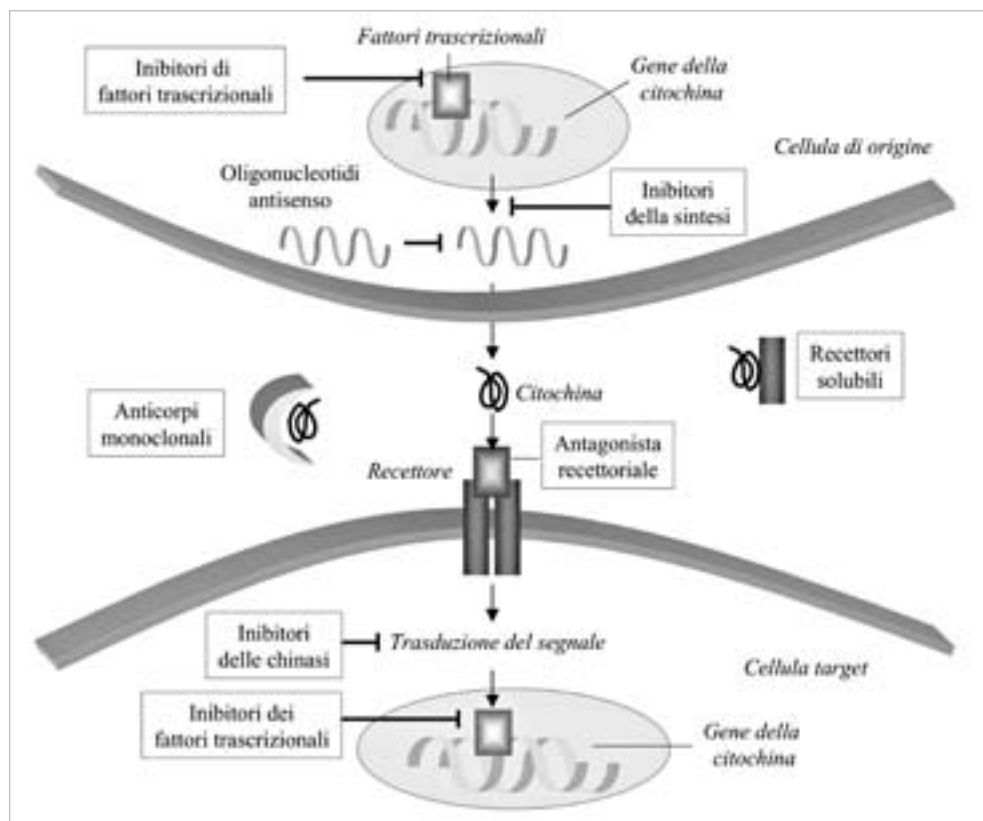
Il riconoscimento della rilevanza patogenetica delle citochine nelle patologie infiammatorie croniche delle vie aeree ha stimolato un crescente interesse verso nuove terapie biologiche indirizzate verso l'inibizione di questa importante categoria di molecole proinfiammatorie<sup>1</sup>.

In questa breve rassegna dopo aver esaminato le possibili strategie farmacologiche di inibizione delle citochine e delle chemochine verrà analizzato il loro potenziale utilizzo nel trattamento dell'asma e della BPCO.

### Strategie farmacologiche per l'inibizione delle citochine e delle chemochine

Gli approcci terapeutici per inibire le citochine pro-infiammatorie si basano essenzialmente sull'utilizzo di farmaci in grado di ridurre la sintesi o gli effetti di queste molecole. Le strategie di inibizione delle citochine pro-infiammatorie possono essere diverse (Fig. 1).

L'effetto inibitorio può realizzarsi a livello della cellula di origine, con farmaci che riducono la sintesi delle citochine a livello genico (corticosteroidi) o modulano l'azione di fattori trascrizionali che regolano l'espressione delle citochine (inibi-



**Figura 1.** Strategie di inibizione delle citochine pro-infiammatorie. Per spiegazioni vedi testo <sup>37</sup>.

tori della calcineurina o oligonucleotidi decoy); a livello delle citochine secrete, con anticorpi monoclonali bloccanti (anti-IL-5) o recettori solubili (recettori solubili per IL-4); a livello della cellula target, con antagonisti recettoriali (antagonisti recettoriali delle chemochine) e farmaci bloccanti le vie di trasduzione del segnale (inibitori di *p38 mitogen-activated protein kinase* – MAPK) o i fattori trascrizionali attivati dalle citochine (inibitori di *signal transducer and activator of transcription 6* – STAT-6).

Infine, è possibile inibire l'azione delle citochine pro-infiammatorie potenziando l'attività delle citochine con attività antinfiammatoria.

## Inibitori delle citochine e chemochine nell'asma

Sebbene le citochine e le chemochine coinvolte nella patogenesi dell'asma siano diverse, al momento, solo per alcune di queste molecole è stato dimostrato un ruolo particolarmente rilevante. È pertanto opportuno, anche in considerazione dei risultati attualmente disponibili, far riferimento alle terapie biologiche anti-citochiniche ed anti-chemochiniche che presentano maggiori potenzialità di sviluppo nel trattamento dell'asma <sup>2</sup>.

### Inibitori di IL-4

L'interleuchina-4 (IL-4) gioca un ruolo importante nell'indurre la sintesi di Ig-E da

parte dei linfociti B ed è coinvolta nel reclutamento degli eosinofili a livello delle vie aeree. Essa, inoltre, risulta fondamentale nel promuovere la differenziazione linfocitaria in senso Th2, regolando a monte le risposte allergiche in un punto di cruciale importanza. Per tali motivi IL-4 risulta essere un bersaglio terapeutico di estremo interesse nell'asma allergico.

L'uso di anticorpi bloccanti IL-4, in animali sottoposti a stimolo allergenico, esercita un effetto inibente sulla iperresponsività bronchiale, sulla metaplasia delle *goblet cell* e sulla eosinofilia polmonare<sup>3</sup>. Studi clinici su pazienti asmatici hanno dimostrato che recettori solubili di IL-4 (sIL-4r), somministrati per via inalatoria, prevengono in modo significativo il peggioramento dell'asma conseguente la sospensione della terapia steroidea<sup>4,5</sup>. I risultati positivi di queste indagini non hanno, tuttavia, trovato conferma in studi condotti su casistiche più ampie e nei pazienti con forme più lievi di asma e, pertanto, questa modalità di trattamento è stata al momento accantonata.

Un altro possibile approccio terapeutico per inibire l'azione di IL-4 è il blocco dei recettori per IL-4 con una forma mutata di IL-4 (BAY36-1677). Questo composto legandosi ai recettori IL-4 $\alpha$  e IL-13 $\alpha$  inibisce sia l'azione di IL-4 che quella di IL-13<sup>6</sup>. Tuttavia il blocco recettoriale risulta estremamente fugace e pertanto questa strategia ha una valenza clinica limitata.

IL-4 e la citochina strettamente associata IL-13, segnalano attraverso un comune recettore di superficie, IL-4 $\alpha$ , che attiva uno specifico fattore trascrizionale STAT-6. La delezione del gene di STAT-6 produce gli stessi effetti del *knockout* genico di IL-4. Pertanto, per limitare gli effetti di IL-4 è stata esplorata la possibilità di inibire STAT-6. Sebbene esistano inibitori peptidici in grado di interferire con l'interazione fra STAT-6 e JAK (*Janus kinases*) legate a IL-4 $\alpha$ , è difficile far giungere questi inibitori a livello intracellulare.

Recentemente è stato individuato un potente inibitore endogeno di STAT-6, denominato SOCS-1 (*suppressor of cytokine signaling-1*), che dal punto di vista terapeutico potrebbe rivelarsi estremamente utile per bloccare selettivamente l'azione della IL-4.

### ***Inibitori di IL-5***

IL-5 è una citochina di cruciale importanza nell'orchestrare l'infiammazione nelle malattie a forte impronta eosinofila come l'asma. Essa è, infatti, responsabile della maturazione e del rilascio degli eosinofili dal midollo osseo. IL-5 viene prodotta da linfociti, mastociti, eosinofili e dalle cellule dell'epitelio e della muscolatura liscia delle vie aeree. L'inibizione di IL-5 potrebbe pertanto attenuare l'infiammazione delle vie aeree. In studi condotti su pazienti con asma persistente di grado lieve<sup>7</sup> e grave<sup>8</sup> l'uso endovenoso di anticorpi monoclonali umanizzati anti-IL-5 (mepolizumab-SB240563 e reslizumab-SCH55700) si è dimostrato sicuro ed ha notevolmente ridotto il numero di eosinofili nel sangue periferico e nell'espettorato; tuttavia, esso non ha determinato effetti significativi sulla risposta all'allergene, sul grado di responsività delle vie aeree, sulla funzione polmonare, sui sintomi e sulla frequenza delle riacutizzazioni. Questi risultati, in qualche modo sorprendenti, hanno fatto sorgere alcuni dubbi circa l'importanza patogenetica degli eosinofili nell'asma. In uno studio successivo<sup>9</sup>, tuttavia, è stato dimostrato che il mepolizumab, pur riducendo marcatamente il numero di eosinofili circolanti, risulta meno efficace nel ridurre gli eosinofili nel tessuto delle vie aeree e nel midollo osseo, e ciò potrebbe giustificare gli scarsi effetti clinici ottenuti con questa molecola. La parziale efficacia evidenziata dagli anticorpi anti-IL-5 potrebbe anche essere spiegata dalla ridondanza nell'attività biologica di altre citochine, quali IL-3 e GM-CSF, in grado anch'esse di indurre la maturazione e l'attivazione degli eosinofili.

Sebbene la mancanza di benefici clinici abbia, in qualche modo, reso poco interessante l'utilizzo della terapia anti-IL-5, un'altra indagine ha dimostrato che il trattamento con mepolizumab riduce la deposizione delle proteine della matrice extracellulare nella membrana basale reticolare e ciò potrebbe avere vantaggiosi riflessi sul processo di rimodellamento delle vie aeree nell'asma <sup>10</sup>.

### ***Inibitori di IL-13***

IL-13 è una citochina di fondamentale importanza nello sviluppo di iperresponsività bronchiale e di altre alterazioni delle vie aeree indotte da esposizione allergenica, pertanto essa rappresenta un target chiave per il trattamento dell'asma <sup>11</sup>. Il lavaggio broncoalveolare (BAL) di soggetti asmatici recuperato dopo stimolo allergenico segmentale contiene proteine IL-13 <sup>12</sup>, mRNA di IL-13 <sup>13</sup> e cellule T che producono IL-13 <sup>14</sup>. Inoltre, polimorfismi del gene che codificano per IL-13 <sup>15</sup>, per componenti del recettore di IL-13 <sup>16</sup>, e per la molecola di trasduzione del segnale STAT-6 <sup>17</sup> si associano tutti ad alti livelli sierici di IgE ed allo sviluppo di patologie atopiche nell'uomo. La stretta associazione fra IL-13 ed asma supporta la potenziale utilità dell'inibizione di questa citochina come approccio terapeutico nell'asma. In modelli murini è stato dimostrato che anticorpi monoclonali anti-IL-13 sopprimono in modo significativo l'iperresponsività delle vie aeree, l'infiltrazione eosinofila, la produzione di citochine pro-infiammatorie e di IgE ed il rimodellamento delle vie aeree <sup>18 19</sup>. Più recentemente, l'efficacia dell'antagonismo di IL-13 è stata dimostrata nei primati <sup>20</sup> che rappresentano un modello sperimentale molto vicino all'uomo. Pertanto, è ipotizzabile un prossimo utilizzo di questa strategia terapeutica anche nei pazienti asmatici.

### ***Inibitori di tumor necrosis factor- $\alpha$***

Il fattore di necrosi tumorale (*tumor necrosis factor* – TNF- $\alpha$ ) è un'importante citochina

della risposta immune innata, che assicura la difesa dell'ospite nei confronti di organismi esterni, prima che si attivi il sistema immune acquisito. Essa viene prodotta prevalentemente dai macrofagi in risposta all'attivazione di molecole di membrana deputate al riconoscimento di particolari prodotti di superficie dei batteri. Un'alterazione delle risposte TNF- $\alpha$  si realizza in diverse patologie infiammatorie fra cui l'artrite reumatoide ed il morbo di Crohn. Un coinvolgimento patogenetico del TNF- $\alpha$  è stato anche dimostrato nell'asma e nella BPCO.

Nelle vie aeree di pazienti con asma è stato dimostrato un aumento dei livelli di proteine e di mRNA di TNF- $\alpha$ . I meccanismi con cui questa citochina esplica la sua azione patogenetica nell'asma sono diversi <sup>21</sup>. Essa, infatti, appare attivamente coinvolta in numerosi processi: nell'interazione mastocita/muscolo liscio e conseguente iperresponsività delle vie aeree; nella chemiotassi di neutrofilo ed eosinofilo; nel potenziamento della citotossicità degli eosinofili sulle cellule endoteliali; nell'attivazione dei linfociti T e nel rilascio da parte di questi di numerose citochine; nell'aumentata espressione epiteliale di molecole di adesione coinvolte nel reclutamento delle cellule T. Oltre a questi meccanismi, operanti in tutte le forme di asma, il TNF- $\alpha$  sembra esplicare una serie di effetti che assumono una peculiare rilevanza patogenetica nelle forme di asma refrattario come il reclutamento dei neutrofilo, l'induzione di steroido-resistenza, la proliferazione di miociti e la stimolazione della crescita fibroblastica con maturazione in miofibroblasti promuovendo l'espressione di TGF- $\alpha$ . L'inibizione dell'azione del TNF- $\alpha$  sembra pertanto una strategia farmacologica estremamente interessante e con notevoli potenzialità soprattutto nel trattamento dell'asma refrattario.

Gli inibitori del TNF- $\alpha$ , attualmente in fase di sperimentazione, includono diversi composti farmacologici: anticorpi monoclonali

non-umani o chimerici (infliximab, afelimomab, e Cytotab), anticorpi umanizzati (adalimumab, CDP-571, CDP-870), recettori solubili umani (onercept) o proteine di fusione del recettore del TNF- $\alpha$  (etanercept), oligonucleotidi antisense (ISIS-104838) che inibiscono la traduzione del mRNA di TNF- $\alpha$  in proteine pre-TNF- $\alpha$ . Un'altra possibile strategia anti-TNF- $\alpha$  è quella di inibire l'enzima TACE (TNF- $\alpha$  *converting enzyme*) che trasforma il pre-TNF- $\alpha$  nella citochina matura.

Gli inibitori del TNF- $\alpha$  attualmente disponibili in commercio sono l'infliximab, l'etanercept, e l'adalimumab. Con tali molecole sono stati effettuati alcuni *trials* clinici nell'asma.

In un primo studio, condotto in aperto su pazienti con asma grave steroideo-dipendente, l'etanercept ha determinato un miglioramento significativo della funzione polmonare, della responsività delle vie aeree e della qualità della vita<sup>22</sup>. Questi risultati positivi sono stati confermati in uno studio randomizzato controllato<sup>23</sup>. In questa indagine la risposta clinica all'etanercept era strettamente correlata con l'espressione di TNF- $\alpha$  e di TNF- $\alpha$ R1 sui monociti. In tal senso, l'espressione monocitaria della citochina e del suo recettore (particolarmente elevata nei pazienti con le forme più gravi di asma) potrebbe rappresentare un utile marker di responsività al trattamento. In un ulteriore studio l'uso di infliximab in pazienti con asma moderata, pur non determinando alcun miglioramento della funzione polmonare, ha comunque ridotto del 50% il numero di riacutizzazioni<sup>24</sup>. In generale, gli inibitori di TNF- $\alpha$  hanno dimostrato una buona tollerabilità, tuttavia restano ancora alcune preoccupazioni relative alla sicurezza d'impiego (potenziale insorgenza di neoplasie ed infezioni) emerse da studi condotti su pazienti con BPCO e artrite reumatoide.

### ***Citochine antinfiammatorie***

Come precedentemente accennato, oltre alle citochine proinfiammatorie, esistono alcune citochine dotate di proprietà antiflogistiche ed immunomodulanti, la cui secrezione potrebbe risultare deficitaria in alcuni pazienti asmatici<sup>25</sup>. In tali soggetti queste molecole potrebbero essere utilizzate terapeuticamente allo scopo di ripristinare a livello delle vie aeree l'equilibrio tra i fattori pro-infiammatori e quelli antinfiammatori.

L'IL-10 è una potente citochina antinfiammatoria ed immunosoppressiva, la cui principale sorgente cellulare nell'apparato respiratorio è rappresentata dai macrofagi alveolari. Lo spettro d'azione della IL-10 è molto ampio. Essa reprime la sintesi di numerose citochine (GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-6) e chemochine (RANTES – *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*; MIP-1 $\alpha$  – *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ; IL-8), inibendo soprattutto l'eosinofiloipoiesi così come l'attivazione e l'accumulo tessutale degli stessi eosinofili. Inoltre, la IL-10 riduce l'espressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II, delle molecole co-stimolatrici B7-1 e B7-2 e delle isoforme inducibili degli enzimi nitrossido sintetasi (iNOS) e ciclossigenasi (COX-2).

L'uso di IL-10 ricombinante umana si è dimostrato efficace nel controllo delle patologie infiammatorie intestinali e nella psoriasi.

Recenti indagini sperimentali condotte in pazienti asmatici hanno permesso di rilevare una diminuita concentrazione di IL-10, rispetto a soggetti normali di controllo, nei monociti circolanti e nel liquido di lavaggio bronco-alveolare<sup>26</sup>. Inoltre, la immunoterapia specifica determina un aumento della produzione di IL-10 da parte dei linfociti T helper e ciò potrebbe contribuire agli effetti benefici di questa forma di trattamento<sup>27</sup>. In modelli animali di flogosi allergica è stata documentata l'efficacia della somministrazione intranasale di IL-10. Nell'uomo IL-10,

somministrata per via sottocutanea in soggetti volontari sani, ha dimostrato una ragionevole tollerabilità, sebbene siano comparsi alcuni effetti collaterali ematologici<sup>28</sup>.

Anche l'IL-12 possiede una notevole attività antiallergica, fondamentale legata alla sua capacità di indurre la differenziazione linfocitaria in senso Th1. In modelli sperimentali animali, il trattamento con IL-12 ricombinante ha inibito la produzione di IgE ed ha determinato una riduzione dell'infiammazione eosinofila conseguente alla stimolazione allergenica. Purtroppo, le indagini cliniche preliminari, effettuate per valutare gli effetti della somministrazione per via endovenosa della IL-12 nell'uomo, hanno rivelato una inaspettata tossicità, caratterizzata da iperpiressia, anemia, linfopenia e neutropenia. Forse, tali problemi potrebbero essere in futuro superati mediante la realizzazione di preparazioni farmaceutiche somministrabili per via inalatoria, che consentirebbero di sfruttare selettivamente a livello delle vie aeree la potente azione inibitrice di questa citochina sulla risposta linfocitaria Th2 e sulla flogosi allergica.

Un effetto inibitorio sulle cellule Th2 è indotto anche dall'IFN- $\gamma$ , che riduce la sintesi di IL-4 e IL-5 ed, impiegato per via aerosolica in topi sensibilizzati, attenua l'infiltrazione polmonare eosinofila allergene-dipendente<sup>29</sup>. Tuttavia, somministrato attraverso la stessa via a pazienti asmatici, ha causato soltanto una lieve riduzione del numero degli eosinofili presenti nel liquido di lavaggio bronco-alveolare. Probabilmente, questi deludenti risultati sono dovuti alle difficoltà di accesso della proteina inalata alle vie aeree umane, dove evidentemente l'IFN- $\gamma$  non raggiunge una adeguata concentrazione a livello dei *target* cellulari.

### **Inibitori delle chemochine**

Le chemochine sono citochine chemiotattiche di piccole dimensioni, sintetizzate da cellule infiammatorie e strutturali, in grado

di indurre l'attivazione e la migrazione delle cellule effettrici della risposta immunitaria ed infiammatoria nei siti di flogosi. In rapporto alla disposizione dei residui di cisteina, situati all'estremo amino-terminale, sono distinguibili quattro gruppi: CXC ( $\alpha$  chemochine), CC ( $\beta$  chemochine), CX<sub>3</sub>C (fractalchine) e C (linfotattine).

Alcune  $\beta$  chemochine, quali RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1,2,3 e 4 (*monocyte chemotactic peptides*-1,2,3 e 4), eotassina 1 e 2, assumono particolare rilevanza nella patogenesi della flogosi asmatica per la loro capacità di indurre a livello delle vie aeree il reclutamento selettivo e l'attivazione di eosinofili, linfociti Th2 e basofili.

Le chemochine esercitano la loro azione chemiotattica interagendo con recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G. Sono stati identificati cinque recettori per le  $\alpha$  chemochine (CXCR1-CXCR5), nove recettori per le  $\beta$  chemochine (CCR1-CCR9), un recettore per le fractalchine (CX<sub>3</sub>CR1) e per le linfotattine (XCR1). Questi recettori presentano una espressione differenziata su vari tipi cellulari in quanto gli eosinofili esprimono CCR1 e CCR3, i basofili CCR3 e CCR4, i linfociti Th2 CCR3 e CCR4, mentre CXCR3 è ristretto ai linfociti Th1. Alcuni recettori interagiscono selettivamente con un solo ligando, altri sono promiscui e mediano gli effetti di più chemochine.

Ai fini di un potenziale intervento nel trattamento dell'asma, assume preminente importanza il recettore CCR3, specifico per l'eotassina ed anche in grado di legare le altre più importanti chemochine eosinofilotattiche (RANTES, MCP-3 ed MCP-4). Lo sviluppo di specifici antagonisti del recettore CCR3, interferendo con il reclutamento di eosinofili, basofili e linfociti Th2, ma non Th1, potrebbe quindi risultare notevolmente vantaggioso nel controllo della flogosi asmatica.

A tal fine, sono state esplorate strategie diverse: anticorpi monoclonali CCR3-bloc-

canti; chemochine modificate all'estremità amino-terminale quali Met-RANTES, in grado di legarsi al recettore senza trasdurre il segnale; inibitori sintetici non-peptidici. Le prime esperienze effettuate hanno dato risultati interessanti anche per quanto concerne la sicurezza, tenuto conto che l'espressione di CCR3 è ristretta ad eosinofili, basofili e linfociti Th2.

### **Inibitori delle citochine e chemochine nella broncopneumopatia cronica ostruttiva**

I farmaci attualmente disponibili per il trattamento della BPCO hanno dimostrato una scarsa efficacia nel risolvere l'infiammazione cronica delle vie aeree e nel prevenire la distruzione del tessuto polmonare e l'associato declino funzionale. C'è pertanto una urgente necessità di terapie maggiormente efficaci indirizzate specificamente verso le principali componenti cellulari e molecolari implicate nella patogenesi della malattia<sup>30</sup>. Fra i nuovi approcci farmacologici, l'inibizione di alcune citochine e chemochine ha dimostrato interessanti risultati ed è auspicabile che questa strategia possa fornire in un prossimo futuro più efficaci strumenti terapeutici per la BPCO.

#### ***Inibitori di tumor necrosis factor $\alpha$***

Il TNF- $\alpha$ , così come per l'asma, anche nella BPCO rappresenta una citochina pro-infiammatoria di estrema rilevanza patogenetica. Essa esplica numerosi effetti infiammatori ed è particolarmente importante per la migrazione e l'attivazione delle cellule flogistiche soprattutto dei neutrofili. Nei pazienti con BPCO sono state riscontrate alte concentrazioni di TNF- $\alpha$  nell'espettorato indotto e nel plasma, ed inoltre elevate quantità di mRNA di TNF- $\alpha$  sono state evidenziate nella muscolatura scheletrica. D'altra parte,

la grave perdita di massa muscolare che si realizza in molti pazienti con BPCO può derivare dall'apoptosi delle cellule muscolari scheletriche indotta dal TNF- $\alpha$ . Polimorfismi genici per questa citochina si associano ad un aumento di incidenza della BPCO e ad una prognosi più severa della malattia.

In rapporto al suo rilevante ruolo patogenetico, il TNF- $\alpha$  rappresenta un *target* molecolare di notevole interesse per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nella BPCO. Tuttavia, i dati relativi all'efficacia sui farmaci inibitori del TNF- $\alpha$  in questa patologia sono ancora scarsi. In uno studio randomizzato controllato, condotto in 22 pazienti fumatori con BPCO, è stato dimostrato che il trattamento con infliximab non produce significativi miglioramenti dei sintomi respiratori, della qualità della vita e dei parametri di funzionalità respiratoria<sup>31</sup>. Più recentemente, in uno studio simile condotto su oltre duecento pazienti, è stata confermata la mancanza di efficacia dell'infliximab su diversi parametri, comprese le riacutizzazioni respiratorie. Inoltre, in questa indagine è stata evidenziata una maggiore incidenza, anche se non statisticamente significativa, di neoplasie e infezioni polmonari nei pazienti trattati con infliximab rispetto a quelli trattati con placebo<sup>32</sup>. In uno studio osservazionale, condotto su un alto numero di pazienti affetti sia da artrite reumatoide che da BPCO, è stata dimostrata una riduzione del 50% delle ospedalizzazioni per BPCO nei pazienti trattati con etanercept, mentre nessun effetto è stato osservato in quelli trattati con infliximab<sup>33</sup>. Ulteriori studi su casistiche più ampie si rendono necessari, sia al fine di definire meglio l'efficacia degli inibitori del TNF- $\alpha$ , sia per verificare con maggiore accuratezza la sicurezza d'impiego di questi composti.

#### ***Inibitori di IL-1***

Il fumo di sigaretta ed il lipopolisaccaride (LPS) stimolano i macrofagi e le cellule epiteliali a produrre IL-1, che a sua volta induce



la produzione di TNF- $\alpha$  da parte dei macrofagi. Le strategie anti-IL-1 comprendono l'uso dell'antagonista solubile endogeno per il recettore di IL1 (sIL-1Ra), anticorpi diretti verso il recettore di IL-1, proteine di legame per IL-1 (IL-1 Trap), anticorpi anti-IL-1 $\beta$  (CDP 484) ed inibitori dell'enzima di conversione di IL-1 $\beta$  (ICE). Un antagonista ricombinante del recettore di IL-1 (anakinra), già approvato per il trattamento dell'artrite reumatoide, è stato utilizzato in pazienti con BPCO, ed i primi risultati sembrano evidenziare un aumentato rischio di infezioni batteriche polmonari<sup>34</sup>.

### **Inibitori delle chemochine**

Numerose chemochine, appartenenti soprattutto alle famiglie della CC e CXC chemochine, giocano un ruolo chiave nella patogenesi della BPCO modulando il reclutamento e l'attivazione di importanti cellule infiammatorie (neutrofili, macrofagi e linfociti T CD8+). Pertanto, gli inibitori di queste chemochine o gli antagonisti dei loro recettori rappresentano un *target* farmacologico di elevato interesse terapeutico.

Al fine di ridurre la chemiotassi neutrofila assume rilevanza l'inibizione delle CXC chemochine IL-8 (CXCL8) e GRO- $\alpha$  (*growth-related oncogene- $\alpha$*  o CXCL1) o dei loro recettori CXCR1-2. La IL-8 è iperespressa nella BPCO ed i suoi livelli nell'espettorato correlano con la gravità della malattia. L'uso di un anticorpo monoclonale verso IL-8 (ABX-IL-8) è stato sperimentato recentemente in pazienti con BPCO<sup>35</sup>. Sebbene questo anticorpo abbia attenuato l'entità della dispnea, esso non ha migliorato significativamente la funzionalità polmonare, la qualità della vita e la *performance* del test del cammino. Un'altra strategia per ridurre la chemiotassi neutrofila, attualmente in fase di valutazione, è quella di bloccare i recettori per IL-8, in particolare CXCR2, avvalendosi di antagonisti non peptidici di piccole dimensioni.

La migrazione dei monociti/macrofagi nel polmone dei pazienti con BPCO è in gran parte mediata dalle CC chemochine ed in particolare da *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1 o CCL2) che agisce sul recettore CCR2, e da *macrophage inflammatory proteins 1 $\alpha$*  (MIP-1  $\alpha$  o CCL3) e 1 $\beta$  (MIP-1  $\beta$  o CCL4) che agiscono sul recettore CCR5. Sia le CC chemochine che i loro recettori sono altamente espressi sui macrofagi e sulle cellule epiteliali dei pazienti con BPCO e pertanto rappresentano un *target* interessante per lo sviluppo di piccole molecole antagoniste.

Infine, in considerazione della ricca presenza di linfociti T CD8+ nei polmoni dei pazienti con BPCO e del possibile ruolo patogenetico che queste cellule hanno nello sviluppo di enfisema, può essere considerata una valida strategia quella di inibire il recettore CXCR3 ed il suo ligando CXCL10 o IP-10 (*interferon inducible protein-10*) entrambi altamente espressi nelle vie aeree periferiche dei pazienti con BPCO<sup>36</sup>.

### **Bibliografia**

- 1 Pelaia G, Vatrella A, Calabrese C, et al. *New perspectives in asthma treatment*. Allergy 2000;55 (Suppl. 61):60-6.
- 2 Vatrella A, Pelaia G, Mattiello A, et al. *Nuove prospettive nella terapia dell'asma*. In: Vatrella A, Marsico SA, Bariffi F. *Farmacoterapia dell'asma bronchiale*. Padova: Ed. Piccin 2002.
- 3 Gavett SH, O'Hearn DJ, Karp CL, et al. *Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice*. Am J Physiol 1997;272:L253-L261.
- 4 Borish LC, Nelson HS, Lanz MJ, et al. *Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo controlled trial*. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:1816-23.
- 5 Borish LC, Nelson HS, Corren J, et al. *Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma*. J Allergy Clin Immunol 2001;107:963-70.

- 6 Shanafelt AB, Forte CP, Kasper JJ, et al. *An immune cell-selective interleukin-4 agonist*. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:9454-8.
- 7 Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, et al. *Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response*. Lancet 2000;356:2144-8.
- 8 Kips JC, O'Connor BJ, Langley SJ, et al. *Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study*. Am J Respir Crit Care Med 2003;15:1655-9.
- 9 Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, et al. *Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway*. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:199-204.
- 10 Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, et al. *Robinson D, Kay AB. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics*. J Clin Invest 2003;112:1029-36.
- 11 Wills-Karp M. *Interleukin-13 in asthma pathogenesis*. Immunol Rev 2004;202:175-90.
- 12 Huang SH, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, et al. *IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma*. J Immunol 1995;155:2688-94.
- 13 Prieto J, Lensmar C, Roquet A, et al. *Increased interleukin-13 mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells of atopic patients with mild asthma after repeated low-dose allergen provocations*. Respir Med 2000;94:806-14.
- 14 Bodey KJ, Semper AE, Redington AE, et al. *Cytokine profiles of BAL T cells and T-cell clones obtained from human asthmatic airways after local allergen challenge*. Allergy 1999;54:1083-93.
- 15 Vercelli D. *Genetics of IL-13 and functional relevance of IL-13 variants*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2002;2:389-93.
- 16 Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, et al. *Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling*. Immunol Today 2000;21:60-4.
- 17 Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, et al. *Linkage and association studies of STAT-6 gene polymorphisms and allergic diseases*. Int Arch Allergy Immunol 2003;131:33-8.
- 18 Yang G, Volk A, Petley T, et al. *Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyper-responsiveness, inflammation and airway remodeling*. Cytokine 2004;28:224-32.
- 19 Kumar RK, Herbert C, Webb DC, et al. *Effects of anticytokine therapy in a mouse model of chronic asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:1043-8.
- 20 Bree BS A, Schlerman FJ, Wadanoli M, et al. *IL-13 blockade reduces lung inflammation after Ascaris suum challenge in cynomolgus monkeys*. J Allergy Clin Immunol 2007;5:1251-7.
- 21 Berry M, Brightling C, Pavord I, et al. *TNF-alpha in asthma*. Curr Opin Pharmacol 2007;7:279-82.
- 22 Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, et al. *Tumor necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma*. Thorax 2005;60:1012-8.
- 23 Berry MA, Hargadon B, Shelley M, et al. *Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma*. N Engl J Med 2006;354:697-708.
- 24 Erin EM, Leaker BR, Nicholson GC, et al. *The effects of a monoclonal antibody directed against tumor necrosis factor-alpha in asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2006;174:753-62.
- 25 Barnes PJ. *Endogenous inhibitory mechanisms in asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:176-81.
- 26 Borish L, Aarons A, Rumbly J, et al. *Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma*. J Allergy Clin Immunol 1996;97:1288-96.
- 26 Saetta M, Carpenter DC, Panina-Bordignon C, et al. *Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1404-9.
- 27 Akdis CA, Blesken T, Akdis M, et al. *Role of interleukin 10 in specific immunotherapy*. J Clin Invest 1998;102:98-106.
- 28 Yamagata T, Ichinose M. *Agents against synthesis or receptors. Agents against cytokine synthesis or receptors*. Eur J Pharmacol 2006;533:289-301.
- 29 Lack G, Bradley KL, Hamelmann E, et al. *Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice*. J Immunol 1996;157:1432-9.

- <sup>30</sup> Pelaia G, Vatrella A, Gallelli L, et al. *Biological targets for therapeutic interventions in COPD: clinical potential*. International Journal of COPD 2006;1:321-34.
- <sup>31</sup> van der Vaart H, Koeter GH, Postma DS, et al. *First study of infliximab treatment in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:465-9.
- <sup>32</sup> Rennard SI, Fogarty C, Kelsen S, et al. *The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:926-34.
- <sup>33</sup> Suissa S, Ernst P, Hudson M. *TNF- $\alpha$  antagonists and the prevention for hospitalisation for chronic obstructive pulmonary disease*. Pulm Pharmacol Ther 2007, doi:10.1016/j.pupt.2007.03.003
- <sup>34</sup> de Boer WI. *Perspective for cytokine antagonist therapy in COPD*. Drug Discov Today 2005;10:93-106.
- <sup>35</sup> Maheler DA, Huang S, Tabrizi M, et al. *Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing IL-8 in COPD; a pilot study*. Chest 2004;126:926-4.
- <sup>36</sup> Barnes PJ. *New drugs for asthma*. Nat Rev Drug Discov 2004;3:831-44.

## IMMUNOTERAPIA SPECIFICA: NUOVE PROSPETTIVE

Giovanni Passalacqua, Gennaro Liccardi\*

Clinica di Malattie dell'Apparato Respiratorio ed Allergologia, Università di Genova;

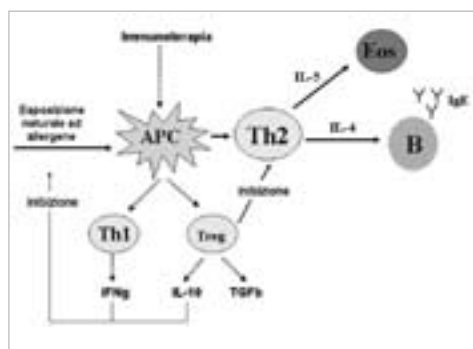
\*U.O.C. di Malattie Respiratorie e Allergiche, A.O. ad Alta Specializzazione e di Rilievo Nazionale "A. Cardarelli", Napoli

### Introduzione

L'immunoterapia specifica o ITS consiste nel somministrare quantità crescenti della sostanza (allergene) che provoca nel soggetto le manifestazioni cliniche di allergia, ossia l'asma o la rinite. Lo scopo è appunto quello di rendere il paziente *tollerante* verso tale allergene, o meglio, di *desensibilizzarlo*. La storia dell'ITS comincia nel 1911, con i primi tentativi empirici di ITS per la febbre da fieno<sup>1</sup>. L'approccio era intuitivamente quello di vaccinare il paziente proprio come si faceva per le malattie infettive. In effetti, pur non conoscendo i meccanismi dell'allergia, i risultati ottenuti furono favorevoli. Da allora l'ITS nella sua forma sottocutanea (SCIT) è stata largamente utilizzata, talvolta anche in maniera non corretta o non adeguata<sup>2</sup>. Il generale processo di revisione critica, durato per tutta la seconda metà del '900, è culminato nel 1998 con la pubblicazione di un documento dell'Organizzazione Mondiale della Sanità<sup>3</sup>, il quale stabilisce validità, limiti e regole di impiego dell'immunoterapia, basandosi esclusivamente su dati scientifici comprovati. A causa dei problemi di sicurezza, a partire dagli anni '90 sono state proposte altre vie di somministrazione (non iniettive), tra le quali quella sublinguale (SLIT) ha rapidamente acquisito conferme scientifiche ed

è attualmente considerata una ragionevole alternativa alla SCIT<sup>3-5</sup>.

Il principale meccanismo di azione dell'ITS è la regolazione della risposta dei linfociti T-helper (Th) all'allergene<sup>5,6</sup>. Verosimilmente attraverso le cellule T regolatorie, l'ITS ridireziona la risposta di tipo Th2 (allergica) verso una risposta Th1 (normale risposta al non-self) (Fig. 1). Il risultato è che l'ITS non è un trattamento sintomatico, ma un modulatore della risposta biologica. La sua azione non è quindi immediata come per i farmaci, ma richiede alcuni mesi per esplicarsi. Inoltre, a differenza dei farmaci, l'ITS mantiene l'efficacia anche per anni dopo la sospensione e modifica la storia naturale della malattia<sup>7-9</sup>.



**Figura 1.** Schema dei possibili meccanismi dell'ITS (APC: antigen presenting cell; IFN: interferon; TGF: tumor growth factor; Treg: linfocita T regolatorio).

Attualmente, l'ITS è utilizzata, sempre in associazione ai farmaci, nel trattamento dell'asma, della rinite e dell'allergia a veleno di imenotteri<sup>3 4 10</sup>. Sia nella forma sottocutanea tradizionale, che nella più nuova SLIT, l'estratto allergenico o vaccino viene somministrato per un certo periodo a dosi crescenti (build-up), fino al raggiungimento della dose massima tollerata (mantenimento) che si somministra una volta al mese nella forma iniettiva e a giorni alterni o giornalmente nella forma sublinguale. La somministrazione iniettiva, se correttamente effettuata, è relativamente sicura anche se esiste un residuo rischio di reazioni gravi o fatali, mentre la SLIT ha un miglior profilo di sicurezza ed è autogestita dal paziente. In entrambi i casi, la prescrizione (e la somministrazione) dovrebbe essere sempre affidata allo specialista (Tab. I). La sempre più dettagliata conoscenza dei

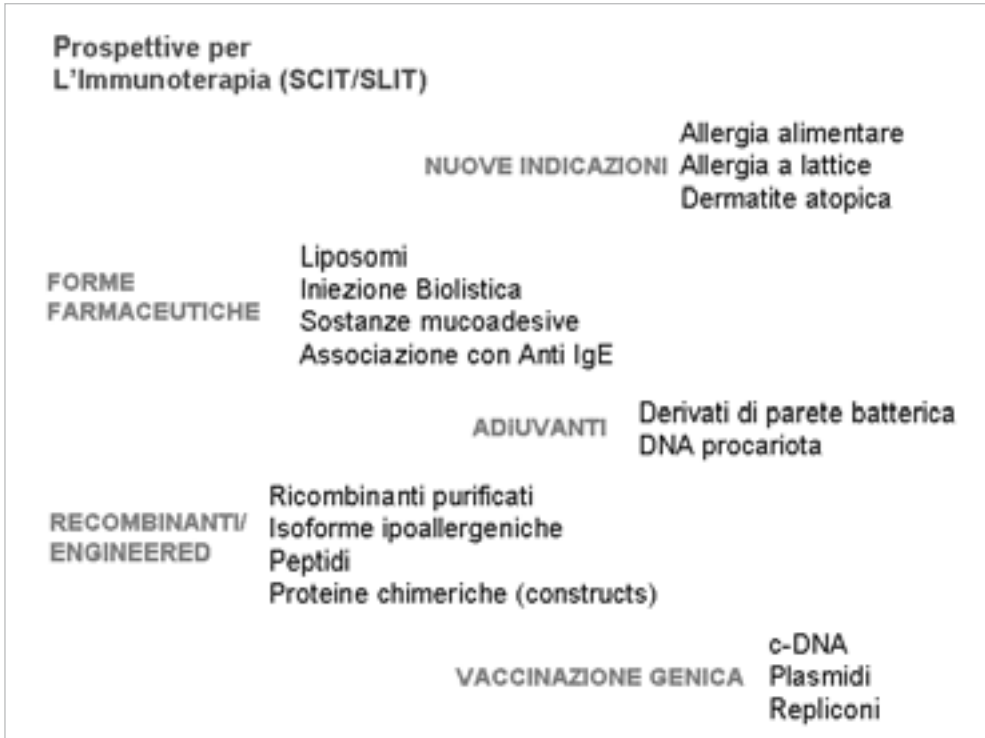
meccanismi della reazione allergica, l'individuazione delle cellule regolatorie, di recettori e citochine, in associazione con la biologia molecolare e l'ingegneria genetica, hanno consentito di esplorare nuove e sempre più sofisticate forme di immunoterapia, nelle quali il determinante comune rimane comunque la somministrazione dell'allergene. Tali nuove forme coinvolgono sia la modalità di somministrazione, sia la preparazione farmaceutica, sia la composizione del vaccino (Fig. 2).

### Le nuove formulazioni per la somministrazione

Per ovvi motivi, una delle principali linee di ricerca per il miglioramento dell'ITS è sempre stata quella di una più tollerata e sicura

**Tabella I. Punti chiave dell'immunoterapia allergene specifica.**

|  |   |
|--|---|
| <b>Meccanismi</b>                      | L'ITS è un trattamento immunomodulante che agisce su diversi punti della risposta immunitaria agli allergeni. Riequilibra lo sbilanciamento Th2/Th1. L'effetto si ha quindi nel medio-lungo termine. È specifica per l'allergene e non per il sintomo                 |
| <b>Associazione con i farmaci</b>      | Non sostituisce i farmaci, ma si associa ad essi con lo scopo di ridurre gradualmente il loro uso   |
| <b>Effetti che i farmaci non hanno</b> | Mantiene l'efficacia per anni dopo la sua sospensione. Previene l'insorgenza di nuove sensibilizzazioni. Riduce il rischio di sviluppare asma   |
| <b>Indicazioni accertate</b>           | Allergia a veleno di imenotteri, allergia al latte. Allergia ad inalanti  |
| <b>Somministrazione</b>                | Sottocutanea (SCIT).<br>Sublinguale (SLIT).<br>Intranasale (LNIT). Solo per la rinite. Sempre meno utilizzata   |
| <b>Sicurezza</b>                       | L'ITS iniettiva se ben praticata ed avendo a disposizione i presidi per il trattamento dell'anafilassi e delle gravi reazioni è da considerarsi sicura. Non ci sono segnalazioni di avversi gravi o fatali con la SLIT  |
| <b>Inizio, durata e monitoraggio</b>   | L'ITS si inizia 2-4 mesi prima della stagione pollinica. Nel caso di allergeni perenni non esiste un periodo specifico per l'inizio. La durata ottimale è di 3-5 anni. Il monitoraggio di efficacia è solo clinico (sintomi e uso di farmaci)                         |
| <b>Principali raccomandazioni</b>      | Accertare il meccanismo IgE mediato e il ruolo causale dell'allergene. Usare solo vaccini standardizzati e di comprovata efficacia. Nel caso dell'ITS iniettiva valutare sempre il paziente e le eventuali pregresse reazioni e tenere in osservazione per 30 minuti. |



**Figura 2.** Le prospettive per l'ITIS.

formulazione farmaceutica. In questo senso, i liposomi sembrano essere molto promettenti in quanto membrane fosfolipidiche “fisiologiche” che consentono un rilascio controllato dell’allergene. Inoltre, i liposomi possono anche agire da adiuvanti se opportunamente formulati<sup>11</sup>. Attualmente esiste un solo studio nell’uomo controllato e randomizzato con allergene degli acari incapsulato in liposomi. Tale studio ha dimostrato un’efficacia paragonabile all’ITS tradizionale, con pochissimi effetti collaterali ed una riduzione addizionale della broncoreattività non specifica<sup>12,13</sup>. Un’altra interessante prospettiva è rappresentata dall’iniezione senza ago, grazie ad un apposito flusso molecolare ad altissima pressione (tecnica biolistica). Tale tecnica è stata già applicata ad altri tipi di vaccinazione<sup>14</sup> e solo di recente è stata proposta in un modello animale per l’ITS. In

tale modello, la somministrazione biolistica è stata in grado di indurre un’efficiente deviazione Th2 → Th1<sup>15</sup>. Infine, per quanto riguarda la via sublinguale, un potenziale miglioramento potrebbe essere costituito da sostanze bioadesive, che aumentano il tempo di permanenza dell’allergene sulle mucose<sup>16</sup>.

### Immunoterapia con adiuvanti

Gli adiuvanti sono molecole solitamente inorganiche o piccole molecole organiche prive di potere antigenico di per sé, ma in grado di potenziare la risposta immunitaria quando somministrate insieme ad un antigene<sup>17</sup>. Nell’immunologia classica si utilizzano come adiuvanti lisati batterici o emulsioni oleose. Tuttavia, per l’utilizzo umano, un adiuvante dovrebbe essere non tossico, non

irritante, non immunogeno e soprattutto capace di indurre una risposta di tipo Th1, se somministrato assieme ad un allergene. Potenziando l'effetto dell'allergene, ci si aspetta di doverne somministrare quantità minori. In questo senso sono stati fatti diversi tentativi, di cui alcuni hanno portato a buoni risultati clinici<sup>18</sup>.

### **Adjuvanti batterici**

Uno degli adjuvanti scoperti di recente e quindi utilizzati per l'ITS è derivato dalla parete batterica di una *Salmonella non patogena* (*Salmonella Minnesota*) ed è denominato *monophosphoril-lipid A* (MPLA). Il MPLA non è tossico né irritante e produce un'intensa risposta Th1 sia nell'animale che nell'uomo<sup>19,20</sup>. Esiste uno studio randomizzato e controllato nell'uomo in cui la somministrazione di solo 4 iniezioni di ITS per graminacee con MPLA è stata dimostrata efficace almeno quanto l'ITS tradizionale nel ridurre i sintomi di oculorinite<sup>21</sup>, con la contemporanea induzione delle tipiche modificazioni immunologiche<sup>22</sup>. Per tale prodotto, che è già attualmente in commercio, esiste anche uno studio in aperto nei bambini ed adolescenti<sup>23</sup>.

### **Adjuvanti a base di DNA**

Circa 10 anni fa, nel corso di esperimenti di transfezione nell'animale, venne osservato che la somministrazione di plasmidi costituiti da DNA batterico aveva un potentissimo effetto Th1 inducente<sup>24</sup>. Responsabili dell'effetto adjuvante sono particolari brevi sequenze di DNA tipiche della cellula procariota e chiamate *ISS-ODN* (*immunostimulatory sequences-oligodeoxynucleotide*<sup>25</sup>). Tali sequenze sono riconosciute dal *toll like receptor 9* delle cellule dendritiche e sono responsabili dell'attivazione della risposta Th1 ai batteri nel contesto dell'immunità innata<sup>26</sup>. Venne immediatamente prospettato l'utilizzo dei ISS-ODN come adjuvanti per l'ITS ed infatti fu rapidamente sintetizzato

un coniugato di allergene maggiore di ambrosia (Amb a 1) e ISS-ODN<sup>27</sup>. Tale allergene *DNA adjuvanted* è stato dimostrato capace di indurre risposta Th1 anche nell'uomo, con buon profilo di sicurezza<sup>28</sup>. Di recente è stato pubblicato il primo trial clinico randomizzato e controllato, condotto in 25 adulti con allergia all'ambrosia<sup>29</sup>. In tale studio, il trattamento stagionale con il coniugato Amb a 1-ISS-ODN ha causato una netta riduzione dei sintomi e del consumo di farmaci, non solo nella stagione pollinica immediatamente seguente la somministrazione, ma anche nella stagione pollinica dell'anno successivo.

### **Adjuvanti sintetici**

In parallelo agli studi su adjuvanti biologici, vengono effettuate anche ricerche su adjuvanti più semplici e meno costosi. Uno dei più promettenti per la futura sperimentazione umana sembra essere un particolare tipo di adenina modificata chimicamente, che è in grado, almeno *in vitro*, di riequilibrare la risposta immunitaria in senso Th1<sup>30</sup>.

## **Immunoterapia con peptidi allergenici**

Il razionale di questo approccio sta nel fatto che le IgE specifiche riconoscono l'allergene nella sua conformazione tridimensionale, ossia come molecola completa, mentre le *antigen presenting cells* ed i linfociti T riconoscono solo alcune sequenze lineari della proteina. Pertanto, se invece di somministrare la proteina allergenica completa si somministrano solo dei peptidi rilevanti, non si ha più l'attivazione della reazione IgE mediata pur mantenendo l'efficacia immunogena. Esistono peraltro dimostrazioni in modelli sperimentali che opportune miscele di peptidi da allergene inducono una inattivazione funzionale dei T linfociti<sup>31</sup>. I primi tentativi nell'uomo sono stati effettuati con miscele di

peptidi derivati dall'allergene del gatto Fel d 1 somministrati a dosi variabili tra 7,5 e 750 mcg per iniezione<sup>32-35</sup>. Inaspettatamente, in tali studi, l'efficacia clinica risultava abbastanza marginale a fronte di numerosi effetti collaterali anche gravi. Gli studi successivi, che utilizzavano invece miscele diverse di peptidi parzialmente *overlapping* hanno fornito risultati clinici incoraggianti e hanno mostrato una buona tollerabilità<sup>36-37</sup>. Esistono anche alcuni studi iniziali con peptidi derivati dall'allergene maggiore dell'ape (Api m 1) che hanno dato risultati buoni anche se assolutamente preliminari<sup>38-39</sup>.

## Allergeni ricombinanti, modificati e chimerici

Gli estratti commerciali per la diagnostica e l'ITS, ancorché standardizzati, sono miscele eterogenee che contengono sia proteine allergeniche sia proteine non rilevanti dal punto di vista immunologico. Grazie ai progressi della biologia molecolare e dell'ingegneria genetica è oggi possibile sintetizzare quasi tutti i maggiori allergeni in forma estremamente purificata. In linea di principio questo consente di somministrare per l'ITS solo gli allergeni responsabili della patologia (*tailored immunotherapy*). Nonostante vi siano numerosi studi di base sugli allergeni ricombinanti<sup>40</sup>, il loro utilizzo clinico è stato introdotto solo negli ultimi due anni. Uno studio randomizzato e controllato con l'allergene maggiore di betulla ha dimostrato una riduzione della risposta cutanea nell'uomo associata ad una riduzione della degranolazione dei basofili<sup>41</sup>. Un'altro studio clinico controllato con una miscela di quattro allergeni ricombinanti da graminacee ha fornito incoraggianti risultati clinici, anche se non superiori a quelli ottenuti con l'ITS tradizionale in termini sia di efficacia che di sicurezza<sup>42</sup>. L'approccio molecolare consente inoltre di sintetizzare allergeni mo-

dificati rispetto alla forma nativa e che quindi abbiano minor capacità di legare le IgE (*hypoallergenic isoforms*). Tale risultato può essere ottenuto con tecniche sofisticate come la *site directed mutagenesis*<sup>43</sup>.

La prospettiva più interessante, sebbene ancora futuribile, è quella di vaccinare non con l'allergene ma con i geni che codificano per l'allergene stesso in modo che le cellule dell'organismo producano da sole piccole quantità dell'allergene stesso. Questo può essere fatto utilizzando i cosiddetti repliconi, che contengono sia il gene da replicare sia la DNA replicasi. Al momento l'efficacia immunologica dei repliconi è stata dimostrata solo in modelli animali<sup>44</sup>. Infine, la biologia molecolare consentirebbe di sintetizzare anche proteine chimeriche che contengono gli epitopi di allergeni diversi. In tal caso basterebbe somministrare una sola proteina anche a soggetti sensibilizzati a più allergeni. Al momento è stata sintetizzata una proteina chimerica che contiene parte degli allergeni di betulla e di graminacee, e che ha dimostrato consistenti effetti immunologici nell'animale<sup>45</sup>.

## Nuove indicazioni

Concludiamo questa rassegna sulle prospettive dell'ITS con un cenno essenzialmente clinico, riguardante le possibili indicazioni estese dell'ITS, indipendentemente dalla forma in cui la si somministra. Nelle linee guida internazionali<sup>3</sup> è chiaramente specificato che l'ITS ha indicazione solo nelle allergopatie respiratorie e da veleno di imenotteri. Tuttavia, negli ultimi anni sono stati prodotti studi clinici riguardanti l'impiego di ITS in altri tipi di patologia allergica. I primi studi sono stati condotti con il lattice di gomma, ed in questo caso alcune ITS commerciali sia iniettiva che sublinguale sono già disponibili e utilizzate anche se limiti ed indicazioni non sono ancora completamente definiti<sup>46-50</sup>. L'utilizzo



dell'ITS nell'allergia alimentare è invece più controverso, soprattutto perché con la via sottocutanea si possono verificare reazioni anche gravi. Il problema sembra poter essere ovviato con l'ITS sublinguale, che ha notoriamente un profilo di sicurezza molto favorevole. A questo proposito ricordiamo che è stata segnalata di recente l'efficacia clinica di SLIT per nocciola con incidenza contenuta di effetti collaterali<sup>51</sup>. Infine, i risultati dell'ITS nella dermatite atopica estrinseca sono abbastanza controversi, anche se si segnala in generale un effetto favorevole ma molto variabile. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che alcuni degli studi sono stati condotti per periodi brevi o solo nell'adulto<sup>52</sup>. Con ITS sublinguale per acari della polvere protratta per 18 mesi si sono invece ottenuti risultati decisamente favorevoli nel bambino affetto da dermatite atopica lieve-moderata<sup>53</sup>.

### Bibliografia

- 1 Noon J. *Prophylactic inoculation against hayfever*. Lancet 1911;1:1572-3.
- 2 Committee on Safety of Medicines. *Desensitizing vaccines*. Br Med J 1986;293:948-52.
- 3 Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. *WHO Position Paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases*. Allergy 1998;102:558-62.
- 4 Bousquet J, Van Cauwenberge P. *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*. J Allergy Clin Immunol 2001;108(Suppl. 5):S146-150.
- 5 Passalacqua G, Durham SR. *ARIA update: allergen specific immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol 2007;102:633-7.
- 6 Till SJ, Francis JN, Durham SR. *Mechanisms of immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol 2004;113:1025-34.
- 7 Durham SR, Walker SM, Varga EM, et al. *Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy*. N Engl J Med 1999;341:468-75.
- 8 Moller C, Dreborg S, Ferdousi HA, et al. *Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study)*. J Allergy Clin Immunol 2002;109:251-6.
- 9 Novembre E, Galli E, Landi F, et al. *Coseasonal sublingual immunotherapy reduces the development of asthma in children with allergic rhinoconjunctivitis*. J Allergy Clin Immunol 2004;114:851-7.
- 10 Bonifazi F, Jutel M, Bilo BM, et al; *EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity*. *Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice*. Allergy 2005;60:1459-70.
- 11 Sehra S, Chugh L, Gangal SV. *Polarized TH1 responses by liposome-entrapped allergen and its potential in immunotherapy of allergic disorders*. Clin Exp Allergy 1998;28:1530-7.
- 12 Basomba A, Tabar AI, de Rojas DH, et al. *Allergen vaccination with a liposome-encapsulated extract of Dermatophagoides pteronyssinus: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asthmatic patients*. J Allergy Clin Immunol 2002;109:943-8.
- 13 Alvarez MJ, Echechipia S, Garcia B, et al. *Pteronyssinus vaccination in mild asthma patients: effect of 1-year double-blind, placebo-controlled trial on inflammation, bronchial hyperresponsiveness and immediate and late bronchial responses to the allergen*. Clin Exp Allergy 2002;32:1574-82.
- 14 Trimble C, Lin CT, Hung CF, et al. *Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe*. Vaccine 2003;21:4036-42.
- 15 Kendall M, Mitchell TJ, Costigan G, et al. *Downregulation of IgE antibody and allergic responses in the lung by epidermal biolistic microparticle delivery*. J Allergy Clin Immunol 2006;117:275-82.
- 16 Jalava K, Eko FO, Riedmann E, et al. *Bacterial ghosts as carrier and targeting systems for mucosal antigen delivery*. Expert Rev Vaccines 2003;2:45-51.
- 17 Crameri R, Rhyner C. *Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy*. Curr Opin Immunol 2006;18:761-8.
- 18 Francis JN, Durham SR. *Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives*. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004;4:543-8.
- 19 Wheeler AW, Marshall JS, Ulrich JT. *A Th1-inducing adjuvant, MPL, enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of*

- allergy vaccines*. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;126:135-9.
- 20 Puggioni F, Durham SR, Francis JN. *Monophosphoryl lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th1 responses*. *Allergy* 2005;60:678-84.
- 21 Drachenberg KJ, Wheeler A, Stubner P, et al. *A well tolerated grass pollen specific allergy vaccine containing a novel adjuvant MPL reduces allergy symptoms after only four pre-seasonal injections*. *Allergy* 2001;56:498-505.
- 22 Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ. *Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies*. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1198-208.
- 23 Drachenberg KJ, Heinzkill M, Urban E, et al. *Efficacy and tolerability of short-term specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A (MPL) for children and adolescents*. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2003;31:270-7.
- 24 Raz E, Tighe H, Sato Y. *Preferential induction of a Th1 response and inhibition of IgE formation by plasmid DNA immunization*. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:5141-7.
- 25 Sato Y, Roman M, Tighe H. *Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization*. *Science* 1996;272:352-4.
- 26 Hemmi A, Takeuchi O, Kawai T. *A toll like receptor recognizes bacterial DNA*. *Nature* 2000;408:740-5.
- 27 Horner AA, Takabayashi K, Zubeldia JM, et al. *Immunostimulatory DNA based therapeutics for experimental and clinical allergy*. *Allergy* 2002;57:24-9.
- 28 Creticos PS, Eiden JJ, Broide DH, et al. *Immunotherapy with immunostimulatory oligonucleotides linked to purified ragweed amb a1 allergen: effects on antibody production, nasal allergen provocation, and ragweed seasonal rhinitis*. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:743-4.
- 29 Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, et al.; Immune Tolerance Network Group. *Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis*. *N Engl J Med*. 2006;355:1445-55.
- 30 Fili R. *Redirection of allergen-specific TH2 responses by a modified adenine through Toll-like receptor 7 interaction and IL-12/IFN release*. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:511-7.
- 31 Marcotte G, Braun CM, Norman PS, et al. *Effects of peptide therapy on ex vivo T cell responses*. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:506-13.
- 32 Norman P, Ohman JJ, Long A, et al. *Treatment of cat allergy with T cell reactive peptides*. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1623-8.
- 33 Simons FE, Imada M, Li Y, et al. *Fel d 1 peptides. Effect on skin test and cytokine synthesis in cat allergic patients*. *Int Immunol* 1996;8:1937-45.
- 34 Pene J, Desroches A, Paradis L, et al. *Immunotherapy with Fel d 1 peptides decreases IL-4 release by peripheral blood T cells of patients allergic to cats*. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:571-8.
- 35 Maguire P, Nicodemus C, Robinson D, et al. *The safety and efficacy of ALLERVAX CAT in cat allergic patients*. *Clin Immunol* 1999;93:222-31.
- 36 Oldfield WL, Larchè M, Kay AB. *A double blind placebo controlled study of short-peptides derived from Fel d 1 in cat allergic subjects*. *Lancet* 2002;360:47-53.
- 37 Alexander C, Tarzi M, Larche M, et al. *The effect of Fel d 1-derived T-cell peptides on upper and lower airway outcome measurements in cat-allergic subjects*. *Allergy* 2005;60:1269-74.
- 38 Muller U, Akdis CA, Fricker M, et al. *Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom*. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:747-54.
- 39 Fellrath JM, Kettner A, Dufour N, et al. *Allergen-specific T-cell tolerance induction with allergen-derived long synthetic peptides: results of a phase I trial*. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:854-61.
- 40 Valenta R, Niederberger V. *Recombinant allergens for immunotherapy*. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:826-30.
- 41 Niederberger V, Horak F, Vrtala S, et al. *Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101 (Suppl. 2):14677-82.

- <sup>42</sup> Jutel M, Jaeger L, Suck R, et al. *Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens*. J Allergy Clin Immunol 2005;116:608-13.
- <sup>43</sup> Valenta R, Kraft D. *From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy*. Curr Opin Immunol 2002;14:718-27.
- <sup>44</sup> Gabler M, Scheibelhofer S, Kern K, et al. *Immunization with a low-dose replicon DNA vaccine encoding Phl p 5 effectively prevents allergic sensitization*. J Allergy Clin Immunol. 2006;118:734-41.
- <sup>45</sup> Wild C, Wallner M, Hufnagl K, et al. *A recombinant allergen chimera as novel mucosal vaccine candidate for prevention of multi-sensitivities*. Allergy 2007;62:33-41.
- <sup>46</sup> Sastre J, Fernandez-Nieto M, Rico P, et al. *Specific immunotherapy with a standardized latex extract in allergic workers: a double-blind, placebo-controlled study*. J Allergy Clin Immunol 2003;111:985-94.
- <sup>47</sup> Leynadier F, Herman D, Vervloet D, et al. *Specific immunotherapy with a standardized latex extract versus placebo in allergic healthcare workers*. J Allergy Clin Immunol 2000;106:585-90.
- <sup>48</sup> Bernardini R, Campodonico P, Burastero S, et al. *Sublingual immunotherapy with a latex extract in paediatric patients: a double-blind, placebo-controlled study*. Curr Med Res Opin 2006;22:1515-22.
- <sup>49</sup> Nettis E, Colanardi MC, Soccio AL, et al. *Double-blind, placebo-controlled study of sublingual immunotherapy in patients with latex-induced urticaria: a 12-month study*. Br J Dermatol 2007;156:674-81.
- <sup>50</sup> Cistero Bahima A, Sastre J, Enrique E, et al. *Tolerance and effects on skin reactivity to latex of sublingual rush immunotherapy with a latex extract*. J Invest Allergol Clin Immunol 2004;14:17-25.
- <sup>51</sup> Enrique E, Pineda F, Malek T, et al. *Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract*. J Allergy Clin Immunol 2005;116:1073-9.
- <sup>52</sup> Bussmann C, Bockenhoff A, Henke H, et al. *Does allergen-specific immunotherapy represent a therapeutic option for patients with atopic dermatitis?* J Allergy Clin Immunol 2006;118:1292-8.
- <sup>53</sup> Pajno GB, Caminiti L, Vita D, et al. *Sublingual immunotherapy in mite-sensitized children with atopic dermatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. J Allergy Clin Immunol 2007;120:164-70.

## LA TERAPIA CON OMALIZUMAB DELL'ASMA BRONCHIALE ALLERGICO

Gennaro D'Amato, Giovanni Passalacqua\*

U.O.C. di Malattie Respiratorie e Allergiche, A.O. ad Alta Specializzazione e di Rilievo Nazionale  
"A. Cardarelli", Napoli;

\*Clinica di Malattie dell'Apparato Respiratorio ed Allergologia, Università di Genova

### Introduzione

L'asma è ritenuta una malattia in cui si associano e si intrecciano in modo dinamico eventi flogistici acuti, cronici e di rimodellamento delle vie aeree. L'infiammazione delle vie aeree permane anche durante i periodi di remissione dei sintomi e la sua persistenza è riconducibile alla flogosi bronchiale cronica. La stretta interdipendenza degli eventi infiammatori delle vie aeree nell'asma obbliga ad utilizzare strategie terapeutiche che comprendano l'uso di farmaci attivi sia sulla fase acuta che su quella cronica del processo infiammatorio<sup>1-5</sup>.

Esistono però espressioni d'asma grave in cui l'ostruzione bronchiale permane nonostante l'uso razionale della terapia farmacologica ad alte dosi<sup>6-12</sup>. Ben vengano quindi nuovi trattamenti. Attualmente è disponibile, per il trattamento dell'asma allergico grave, anche l'omalizumab, costituito da anticorpi anti-IgE monoclonali che nel soggetto atopico inibiscono l'attività proinfiammatoria degli anticorpi IgE<sup>13-14</sup>.

Le IgE rappresentano da sempre l'elemento caratteristico e distintivo della reazione allergica. È noto che la sequenza allergene-IgE-mastocita è il *trigger* primario delle reazioni allergiche: la degranolazione IgE-mediata dei mastociti dà inizio alla reazione precoce

(*early phase*) ed innesca il processo che porta alla fase tardiva e, se persiste lo stimolo, all'infiammazione ed al *remodeling* tessutale. Il soggetto atopico è caratterizzato dalla produzione abnorme e continua di IgE specifiche, che sono responsabili dell'insorgere delle reazioni. Inoltre, al di là della reazione allergica è ben noto che le IgE sono in qualche modo sempre legate all'asma, indipendentemente dalla loro specificità e dalla presenza di allergia clinicamente manifesta<sup>15-17</sup>. Per tale motivo, le IgE sono state fin da subito considerate il bersaglio ottimale per un approccio con anticorpi monoclonali specifici, ed infatti l'anti IgE è stato il primo ad essere sviluppato per il trattamento dell'asma.

La storia dell'anti IgE comincia circa 15 anni fa<sup>18-20</sup>. La tecnologia di allora non era avanzata come ai giorni nostri, e quindi lo sviluppo di un anticorpo monoclonale dotato delle caratteristiche ottimali di affinità, sicurezza e farmacodinamica richiese alcuni anni e numerosi tentativi. Il primo anticorpo anti IgE ad essere sviluppato, denominato RHuMAb-E25<sup>20</sup>, era dotato di tutte le caratteristiche ottimali ed infatti venne sottoposto a tutte le fasi preliminari di sperimentazione clinica, fino a giungere alla commercializzazione. Il suo uso nella terapia dell'asma allergico grave, dopo molti studi clinici, è stato approvato dalla *Food and Drug Administration* negli USA

**Tabella I. Caratteristiche biologiche di omalizumab.**

|   |
|---|
| Si lega alle IgE circolanti ma non si lega ai recettori ad alta e a bassa affinità.   |
| (FcεRI e FcεRII) per IgE presenti sulle cellule infiammatorie.  |
| Forma complessi IgE-anti-IgE piccoli e inerti che vengono captati ed eliminati dal sistema reticolo-istiocitario.   |
| Non fissa il complemento né attraverso le vie classiche né alternative.   |
| Riduce i livelli sierici di IgE, che non vanno quindi più a fissarsi ai recettori cellulari e di conseguenza non si determina più l'interazione allergeni-IgE e la conseguente degranulazione mastocitaria con la liberazione di mediatori chimici già sintetizzati né la sintesi di nuovi mediatori chimici. |
| Riduce le risposte infiammatorie bronchiali precoci e tardive verso gli aeroallergeni inalati e ciò indipendentemente dal tipo di sensibilizzazione, sia esso unico (soggetti monosensibili) che indotto da più allergeni (polisensibili).  |

nel 2003 e dall'equivalente istituto europeo (EMA) nel luglio 2005 (Tab. I). L'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), ha approvato anch'essa la limitazione all'uso nell'asma grave unicamente per motivi di costo. Il nome farmacologico attribuito a tale molecola è quello di omalizumab (*Xolair*<sup>TM</sup>).

## Caratteristiche del farmaco

Omalizumab è un anticorpo monoclonale murino umanizzato non-anafilattogeno, che, somministrato per via sottocutanea, in una dose che è in relazione al peso corporeo ed al livello sierico di IgE totali, con un limite fissato attualmente alle 700 UI/L, si fissa alle IgE circolanti a livello del frammento definito C<sub>ε</sub>3. Questo frammento è lo stesso con cui queste immunoglobuline si legano, nel soggetto allergico, ai recettori cellulari delle cellule infiammatorie<sup>20</sup>.

Dopo la somministrazione sottocutanea di omalizumab la concentrazione sierica di IgE circolanti si riduce, dopo circa un'ora e per circa tre settimane, a livelli fino al 90-95% del valore basale. Omalizumab forma piccoli immunocomplessi (trimeri od esameri) che vengono rapidamente eliminati dal sistema reticoloendoteliale<sup>21-24</sup>. Occorre ricordare

che a ridursi sono le IgE libere circolanti. I sistemi commerciali di dosaggio delle IgE (PRIST) non sono in grado di distinguere le IgE libere da quelle complessate con omalizumab e pertanto può accadere che in corso di terapia il valore del PRIST aumenti<sup>25</sup>.

Il risultato finale della somministrazione di omalizumab è che i mastociti e le altre cellule non hanno più IgE sulla membrana cellulare e vengono quindi impediti gli eventi conseguenti alle reazioni allergiche IgE-dipendenti che portano alla degranulazione mastocitaria ed alla successiva liberazione di mediatori chimici proinfiammatori, sia preformati che di neosintesi.

L'attività terapeutica di omalizumab è indipendente dal tipo di sensibilizzazione allergica, sia che essa sia ridotta da allergeni di tipo stagionale come i pollini allergenici, che perenne (acari della polvere, forfora di animali domestici, miceti). È indipendente anche dal fatto che l'allergene sensibilizzante sia unico od associato ad altri, come avviene nei casi di polisensibilizzazione. Se un paziente soffre, oltre che di asma bronchiale, anche di rinite o di altra espressione allergica IgE-mediata, comprese quelle da alimenti, vede migliorare anche i sintomi collegati. Omalizumab inibisce anche la risposta aller-

**Tabella II. Aspetti clinici, relativi all'efficacia ed alla tollerabilità di omalizumab nella terapia dell'asma bronchiale allergico.**

|  |
|--|
| Migliora i sintomi asmatici e riduce la frequenza e l'intensità delle riacutizzazioni broncostruttive, indipendentemente dal tipo di sensibilizzazione allergica, sia essa di tipo stagionale (pollini) che perenne (allergeni liberati dagli acari della polvere, dalla forfora di animali a pelo, etc.). |
| Può essere utilizzato sia nei soggetti con sensibilizzazione ad uno (monosensibili) che a più allergeni (polisensibili).   |
| Nei soggetti affetti oltre che da asma anche da rinite, congiuntivite ed allergia alimentare a patogenesi IgE- mediata, migliora anche questa sintomatologia.  |
| Riduce la necessità di utilizzare o di aumentare il dosaggio di farmaci antiasmatici quali i corticosteroidi ed i $\beta_2$ -stimolanti.   |
| Riduce il numero delle ospedalizzazioni.   |
| Non è controindicata la somministrazione associata con l'immunoterapia specifica, dal momento che omalizumab agisce a livelli differenti della risposta immunitaria.   |
| Semplifica il controllo dell'asma con solo una o due iniezioni sottocutanee mensili.   |
| Migliora la qualità della vita dei pazienti asmatici, aumentando nel lungo periodo il controllo della sintomatologia.  |
| Garantisce una buona sicurezza nel lungo periodo . Può determinare una riduzione della mortalità per asma dal momento che si ritiene che la gravità dell'asma sia collegata alla concentrazione dei recettori per IgE ad alta affinità e questa concentrazione viene ridotta dall'omalizumab.              |

gica cutanea nonché la reazione immediata e quella tardiva delle vie aeree agli stimoli allergenici <sup>26-28</sup>.

È stato infine osservato che la somministrazione protratta per mesi di omalizumab è in grado di inibire la sintesi dei recettori cellulari per IgE, che riprende però dopo la sospensione della terapia <sup>29</sup> e che il farmaco ha azioni antinfiammatorie a spettro più ampio di quanto farebbe supporre il suo meccanismo primario di azione <sup>30-31</sup>.

In generale, si avvantaggiano dell'uso di omalizumab le patologie IgE-mediate sia respiratorie che cutanee ed alimentari.

## Gli studi clinici: efficacia e sicurezza

Esistono oramai numerosissimi *trials* clinici randomizzati e controllati in doppio cieco,

sia su adulti che su soggetti di età pediatrica affetti da asma moderato-severo <sup>32-34</sup>. Essi hanno invariabilmente dimostrato che il trattamento *add-on* con omalizumab è efficace nel ridurre il numero e l'intensità delle esacerbazioni asmatiche nonché l'uso di  $\beta_2$ -agonisti e di corticosteroidi <sup>35-40</sup>. Lo studio registrativo più recente, definito INNOVATE (*Investigation of Omalizumab in severe Asthma Treatment*) condotto al fine di valutare l'utilità e la sicurezza della terapia con anti-IgE nell'asma grave, ha definitivamente confermato che omalizumab è in grado di ridurre in modo significativo la frequenza delle esacerbazioni asmatiche <sup>41</sup>. È da notare il fatto significativo che l'effetto sulle esacerbazioni e sul controllo dell'asma è tanto più evidente quanto più l'asma è grave e la funzione respiratoria è compromessa <sup>42</sup>. Corollario di questi risultati sperimentali è che la qualità della vita dei pazienti con asma

**Tabella III.** *Indicazioni all'impiego clinico di omalizumab.*

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Indicazione elettiva     | Asma allergica grave (fase IV) e non controllata nonostante terapia massimale                                    |
| Indicazioni secondarie   | Rinite allergica<br>Associazione rinite-asma non grave   |
| Indicazioni possibili    | Allergia a lattice o imenotteri<br>Allergia alimentare a rischio di anafilassi<br>Associazione con immunoterapia |
| Indicazioni da esplorare | Asma non allergica o con basse IgE<br>Sindromi da iper-IgE<br>Dermatite atopica<br>S.di Churg-Strauss            |

severa e non controllata, migliora significativamente in tutti i suoi aspetti<sup>43-44</sup>. Sono stati condotti anche studi clinici randomizzati nella rinite allergica<sup>45-47</sup> e tutti hanno confermato l'efficacia dose-dipendente di omalizumab sui sintomi. Tuttavia, è da ricordare che per quanto riguarda la rinite allergica esistono considerazioni di ordine economico (rapporto costo/beneficio) che ne limitano l'indicazione<sup>48</sup>.

Per quanto concerne la sicurezza di impiego, esistono numerose revisioni dei lavori che indicano come gli effetti collaterali non differiscano tra gruppi trattati con omalizumab e gruppi placebo<sup>49</sup>, e simili osservazioni sono state prodotte anche in ambito pediatrico<sup>50</sup>. Recentemente è stato osservato in una popolazione ad alto rischio per infestazione elmintica, che la somministrazione continuata di anti IgE non incrementa la percentuale di infestazione né la risposta alla terapia antielmintica<sup>51</sup>. Parimenti è da ricordare che le segnalazioni di insorgenza di sindrome di Churg-Strauss o insufficienza surrenalica a seguito di trattamento con omalizumab<sup>52</sup> sono da ascrivere non al farmaco di per sé, ma alla brusca sospensione dello steroide sistemico. Tale eventualità va sempre tenuta presente, ricordandosi che

una volta ottenuto il miglioramento clinico dell'asma, la riduzione degli steroidi deve essere graduale.

## Posizionamento in terapia

Nel decidere il corretto posizionamento in terapia e le indicazioni, occorre tenere conto di almeno due fattori principali: da un lato l'entità dell'effetto clinico e la sicurezza e dall'altro i costi. Dai numerosi studi clinici condotti nell'asma, emerge in maniera molto chiara che l'entità dell'effetto è tanto maggiore quanto più grave è l'asma. Altro dato molto chiaro è che anti IgE riduce in maniera significativa il numero di esacerbazioni asmatiche e di esacerbazioni gravi (quelle che richiedono il ricovero in pronto soccorso o in rianimazione). Per quanto riguarda i costi, sono tuttora molto elevati, e si parla di un costo di circa 10.000 \$ per anno per un trattamento a dosaggi medi. Risulta chiaro quindi che omalizumab non è *cost effective* in tutte le forme di asma, ma solo in quelle più gravi. Un più formale e rigoroso studio di farmacoeconomia<sup>53</sup>, che ha tenuto conto del costo della terapia, di omalizumab, dei ricoveri, etc., ha concluso che omalizumab

diventa *cost effective* in pazienti che hanno 5 o più ricoveri all'anno o ricoveri della durata maggiore di 20 giorni. Senza arrivare a tali estremi nella pratica clinica, si può ragionevolmente affermare che l'uso di omalizumab diventa vantaggioso quando i costi totali dell'asma in un paziente (farmaci, ricoveri, visite extra, perdita di giorni lavorativi) controbilanciano il costo dell'anticorpo e riducono la mortalità<sup>54-58</sup>. Pertanto, l'EMEA e l'AIFA italiana hanno stabilito che il posizionamento in terapia è per il momento per quei pazienti di età superiore ai 12 anni, con asma allergico grave e IgE totali tra 30 e 700 kU/L, che rimangono sintomatici o presentano gravi esacerbazioni (stadio IV GINA) nonostante la terapia farmacologica massimale ed ottimale.

## Conclusioni e prospettive

In conclusione la nuova molecola disponibile per la terapia dell'asma allergico grave costituisce una importante integrazione della terapia farmacologica attualmente disponibile e, pur essendo indicata per il trattamento di tutte le allergopatie IgE mediate, il suo uso è previsto attualmente, per motivi di costo, per il trattamento dell'asma allergico grave<sup>59</sup>. Sarà utile verificare in futuro se omalizumab è utile anche per il trattamento dell'asma intrinseco con alti livelli di IgE e se potrà essere utilizzato anche in asmatici allergici con concentrazioni di IgE sieriche superiori ai 700 UI/L. Rimangono aperte, infine, numerose possibilità di impiego (Tab. III), come ad esempio l'associazione con immunoterapia<sup>60</sup> e l'uso in patologie IgE-mediate o IgE correlate diverse dall'asma, quali la dermatite atopica<sup>61</sup>, l'allergia alimentare a rischio di anafilassi<sup>62</sup> e le vasculiti autoimmuni<sup>63</sup>, per le quali sono ad oggi disponibili solo segnalazioni isolate ancorché positive.

## Bibliografia

- 1 Loddenkemper R, Gibson GJ, Sibille Y, eds. *European lung white book. The first comprehensive survey on respiratory health in Europe*. European Respiratory Society ERSJ 2003.
- 2 Masoli M, Fabian D, Holt S, et al. *The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report*. *Allergy* 2004;59:468-78.
- 3 Rabe KF, Adachi M, Lai CK, et al. *Worldwide severity and control of asthma in children and adults: the global asthma insights and reality surveys*. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:40-7.
- 4 D'Amato G, Holgate ST. *The impact of air pollution on respiratory health*. Sheffield, UK: European Respiratory Monograph n. 21, 2002.
- 5 Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, et al. *The role of allergy in the development of asthma*. *Nature* 1999;402:B1-17.
- 6 National Institutes of Health/National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI). *Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. NHLBI/WHO Workshop Report March 2006, Bethesda, MD.
- 7 British Thoracic Society, British Paediatric Society, Research Unit of Royal College of Physicians of London, Kings Fund Centre, National Asthma Campaign. *The British Guidelines on Asthma Management: 1995 Review and Position Statement*. *Thorax* 1997;52:S1-S21.
- 8 Barnes PJ, Woolcock AJ. *Difficult asthma*. *Eur Respir J* 1998;12:1209-18.
- 9 Dolan CM, Fraher KE, Bleecker ER, et al. *TENOR Study Group Design and baseline characteristics of the epidemiology and natural history of asthma: outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;92:32-9.
- 10 Wenzel S. *Severe asthma in adults*. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:149-60.
- 11 Busse WW, Banks-Schiegel S, Wenzel S. *Pathophysiology of severe asthma*. *Allergy Clin Immunol* 2000;106:1033.
- 12 Busse WW, Coffman RL, Gelfand EW, et al. *Mechanisms of persistent airway inflam-*



- mation in asthma. A role for T cells and T-cell products. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:388-93.
- 13 Novak N, Bieber T. *Allergic and nonallergic forms of atopic diseases*. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:252-62.
  - 14 Holloway JA, Holgate ST, Semper AE. *Expression of the high-affinity IgE receptor on peripheral blood dendritic cells: differential binding of IgE in atopic asthma*. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:1009-18.
  - 15 Van Bever HP. *Early events in atopy*. *Eur J Pediatr* 2002;161: 542-6. Epub Aug 15, 2002.
  - 16 Custovic A, Simpson BM, Murray CS, et al. *The National Asthma Campaign Manchester Asthma and Allergy Study*. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13(Suppl.15):32-7.
  - 17 Gore C, Custovic A. *Can we prevent allergy?* *Allergy* 2004;59:151-61.
  - 18 Nakajima K, de Weck AL, Stadler BM. *Effect of anti-IgE antibodies on IgE binding to CD23*. *Allergy* 1989;44:187-91.
  - 19 Chang TW, Davis FM, Sun NC, et al. *Monoclonal antibodies specific for human IgE producing cells: a potential therapeutic for IgE mediated diseases*. *Bio Technology* 1990;8:122.
  - 20 Stadler BM, Stampfli MR, Miescher S, et al. *Biological activities of anti-IgE antibodies*. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;102:121-6.
  - 21 D'Amato G, Bucchioni E, Oldani V. *Treating moderate-to-severe allergic asthma with a recombinant humanized anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab)*. *Treat Respir Med* 2006;5:393-98.
  - 22 Fox JA, Hotaling TE, Struble C, et al. *Tissue distribution and complex formation with IgE of an anti-IgE antibody after intravenous administration in cynomolgus monkeys*. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:1000-8.
  - 23 Liu J, Lester P, Builder S, et al. *Characterization of complex formation by humanized anti-IgE monoclonal antibody and monoclonal human IgE*. *Biochemistry* 1995;34:10474-82.
  - 24 Corne J, Djukanovitch R, Thomas L, et al. *The effect of intravenous administration of chimeric anti IgE antibody on serum IgE levels in atopic subjects. Efficacy, safety and pharmacokinetics*. *J Clin Invest* 1997;99:879-87.
  - 25 Hamilton RG, Marcotte GV, Saini SS. *Immunological methods for quantifying free and total serum IgE levels in allergy patients receiving omalizumab (Xolair) therapy*. *J Immunol Methods* 2005;303:81-91.
  - 26 Boulet L-P, Chapman KR, Cote J, et al. *Inhibitory effects of an anti-IgE antibody E25 on allergen-induced early asthmatic response*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1835-40.
  - 27 Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, et al. *The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early – and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1828-34.
  - 28 Togias A, Corren J, Shapiro G, et al. *Anti-IgE treatment reduces skin test (ST) reactivity*. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:S171.
  - 29 MacGlashan DW, Bochner BS, Adelman DC, et al. *Down-regulation of FcεRI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody*. *J Immunol* 1997;158:1438-45.
  - 30 Djukanovic R, Wilson SJ, Kraft M, et al. *The effects of anti-IgE (omalizumab) treatment on airways inflammation in allergic asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:583-93.
  - 31 Holgate S, Casale T, Wenzel S, et al. *The anti-inflammation effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation*. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:459-65.
  - 32 D'Amato G, Salzillo A, Piccolo A, et al. *A review of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) as add on therapy of severe allergic (IgE-mediated) asthma*. *Therap Clin Risk Man* 2007;3:613-9.
  - 33 D'Amato G. *Therapy of allergic bronchial asthma with anti-IgE monoclonal antibody*. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2003;3:371-6.
  - 34 D'Amato G, Liccardi G, Noschese P, et al. *Anti-IgE Monoclonal Antibody (omalizumab) in the Treatment of Atopic Asthma and Allergic Respiratory Diseases Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 2004;3:227-9.
  - 35 Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ, et al. *Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMab-E25 Study Group*. *N Engl J Med* 1999;341:1966-73.
  - 36 Soler M, Matz J, Townley R, et al. *The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics*. *Eur Respir J* 2001;18:254-61.

- 37 Busse W, Corren J, Lanier BQ, et al. *Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma*. J Allergy Clin Immunol 2001;108:184-90.
- 38 Milgrom H, Berger W, Nayuk A, et al. Treatment of childhood asthma with anti immunoglobulin E antibody. Pediatrics 2001;108:E26.
- 39 Holgate ST, Chuchalin AG, Hebert J, et al. *Efficacy and safety of a recombinant anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) in severe allergic asthma*. Clin Exp Allergy 2004;34:632-8.
- 40 Ayres JG, Higgins B, Chilvers ER, et al. *Efficacy and tolerability of anti-immunoglobulin E therapy with omalizumab in patients with poorly controlled (moderate-to-severe) allergic asthma*. Allergy 2004;59:701-8.
- 41 Humbert M, Beasley R, Ayres J, et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. Allergy 2005;60:309-16.
- 42 Bousquet J, Holgate T, Wenzel S, et al. *Predicting response to omalizumab, an anti-IgE antibody, in patients with allergic asthma*. Chest 2004;125:1378-86.
- 43 Buhl R, Hanf G, Soler M, et al. *The anti-IgE antibody omalizumab improves asthma-related quality of life in patients with allergic asthma*. Eur Respir J 2002;20:1088-94.
- 44 Buhl R, Soler M, Matz J, et al. *Omalizumab provides long-term control in patients with moderate-to-severe allergic asthma*. Eur Respir J 2002;20:73-8.
- 45 Adelroth E, Rak S, Haahtela T, et al. *Recombinant humanized mAb E25, an anti-IgE mAb, in birch pollen-induced seasonal allergic rhinitis*. J Allergy Clin Immunol 2000;106:253-9.
- 46 Casale T, Condemi J, Miller SD, et al. *rhuM-Ab-E25 in the treatment of seasonal allergic rhinitis (SAR)*. Ann Allergy Asthma Immunol 1999;82:75.
- 47 Vignola AM, Humbert M, Bousquet J, et al. *Efficacy and tolerability of anti-immunoglobulin E therapy with omalizumab in patients with concomitant allergic asthma and persistent allergic rhinitis: SOLAR*. Allergy 2004;59:709-17.
- 48 Kaliner MA. *Omalizumab and the treatment of allergic rhinitis*. Curr Allergy Asthma Rep 2004;4:237-44.
- 49 Olivieri C, Polosa R, D'Amato G. *Anti-IgE monoclonal antibody: a new era in the treatment of allergic asthma?* In: Polosa R, Holgate ST, eds. *Asthma: Current treatments. Therapeutic Strategies*. Oxford, UK: Clinical Publishing 2007, p. 91-104.
- 50 Berger W, Gupta N. *Evaluation of long-term safety of the anti-IgE antibody, omalizumab, in children with allergic asthma*. Ann Allergy Asthma Immunol 2003;91:182-8.
- 51 Cruz AA, Lima F, Sarinho E, et al. *Safety on anti-immunoglobulin E therapy with omalizumab in allergic patients at risk of geohelminth infection*. Clin Exp Allergy 2007;37:197-207.
- 52 Winchester DE. *Omalizumab for asthma*. N Engl J Med 2006;355:1281-2.
- 53 Oba Y, Saltzman GA. *Cost-effectiveness analysis of omalizumab in adults and adolescents with moderate-to-severe allergic asthma*. J Allergy Clin Immunol 2004;114:265-9.
- 54 Van Ganse E, Laforest L, Pietri G, et al. *Persistent asthma: disease control, resource utilisation and direct costs*. Eur Respir J 2002;20:260-7.
- 55 Serra-Batles J, Plaza V, Morejon E, et al. *Costs of asthma according to the degree of severity*. Eur Respir J 1998;12:1322-6.
- 56 Godard P, Chanez L, Siraudin L, et al. *Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study*. Eur Respir J 2002;18:61-7.
- 57 Holgate S, Bousquet J, Wenzel S, et al. *Efficacy of omalizumab, an anti-immunoglobulin E antibody, in patients with allergic asthma at high risk of serious asthma-related morbidity and mortality*. Curr Med Res Opin 2001;17:233-40.
- 58 Bousquet J, Cabrera P, Berkman N, et al. *Effect of treatment with omalizumab, an anti-IgE antibody, on asthma exacerbations and emergency medical visits in patients with severe persistent asthma*. Allergy 2005;60:302-8.
- 59 D'Amato G. *Role of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) in the treatment of allergic respiratory diseases*. Eur J Pharmacol 2006;533:302-7.
- 60 Kuehr J, Brauburger J, Zielen S, et al. *Efficacy of combination treatment with anti-IgE plus specific immunotherapy in polysensi-*

- tized children and adolescents with seasonal allergic rhinitis.* J Allergy Clin Immunol 2002;109:274-80.
- <sup>61</sup> Vigo PG, Girgis KR, Pfuetze BL, et al. *Efficacy of anti-IgE therapy in patients with atopic dermatitis.* J Am Acad Dermatol. 2006;55:168-70.
- <sup>62</sup> Leung DYM. *Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy.* N Engl J Med 2003;348:986-93. Epub Mar 2003.
- <sup>63</sup> Giavina-Bianchi P, Giavina-Bianchi M, Agondi R, et al. *Administration of anti-IgE to a Churg-Strauss Syndrome patient.* Int Arch Allergy Immunol 2007;144:155-8.

**Sezione 2**

---

**I BIOMARCATORI IN PNEUMOLOGIA**

*a cura di*

**Bruno Balbi (Veruno, NO)**

*con la collaborazione di*

**Antonio Spanevello (Cassano delle Murge, BA), Mario Malerba (Brescia),  
Massimo Corradi (Parma)**



## UTILITÀ DEI BIOMARCATORI IN PNEUMOLOGIA, BIOMARCATORI INVASIVI E NON INVASIVI

**Bruno Balbi**

*Divisione di Pneumologia Riabilitativa, Fondazione Salvatore Maugeri I.R.C.C.S., Veruno (NO)*

### Cosa si intende per biomarcatori?

I biomarcatori o *biomarkers* sono parametri biologici (cellule, molecole, geni, etc.) che possono essere oggetto di misura e che consentono di rilevare eventi (biochimici, molecolari, genetici, immunologici) a loro volta in grado di influenzare, essere associati e/o predire l'insorgenza e/o l'evoluzione di una malattia o di una condizione di rischio per lo sviluppo di una patologia.

Intesi pertanto in un senso così lato, i biomarcatori rappresentano un vastissimo campo di studio della biologia e della medicina. È nostra intenzione restringere ovviamente il campo trattando prevalentemente dei biomarcatori più utilizzati nelle malattie infiammatorie dell'apparato respiratorio, sia che esse interessino primariamente il parenchima polmonare, ossia le pneumopatie diffuse interstiziali, sia che si tratti di malattie infiammatorie delle vie aeree. Per la trattazione dei biomarcatori correlati a specifici campi di interesse (ad esempio neoplasie, infezioni, etc.) si rimanda il lettore ai capitoli corrispondenti.

I biomarcatori non sono certo una novità nel campo della medicina respiratoria. Se intesi come sopra riportato infatti cosa altro era (ed è tuttora) se non un biomarcatore il riscontro di bacilli acido-alcol resistenti nell'escreato di un paziente con sospetta patologia tuberculare? Similmente, il riscontro sempre nel-

l'epettorato di cellule neoplastiche va anch'esso considerato un biomarcatore, essendo carico di significato clinico, considerazione che vale anche per l'esempio della tubercolosi. Quindi il concetto di ottenere un dato "biologico" che possa integrare quelli ottenuti con altre metodiche e confortare il clinico nel processo diagnostico ed in generale nella gestione del malato respiratorio, fa parte da molto tempo del processo decisionale clinico in Pneumologia. Ciò che ha reso recentemente molto interessante il campo di ricerca dei biomarcatori è la messa a punto negli ultimi anni di nuove metodiche di studio dell'apparato respiratorio (es. la valutazione non invasiva di marcatori nell'aria espirata) associata a nuove conoscenze bio-molecolari della patogenesi di molte malattie respiratorie.

Va comunque sottolineato che la caratteristica principale di un buon biomarcatore, oltre alla sensibilità, specificità ed altre simili proprietà bio-statistiche, è quella di fornire un dato che sia *aggiuntivo* ad altri dati ottenuti con metodiche tradizionali (cliniche, radiologiche, funzionali). In altre parole se il biomarcatore semplicemente conferma il dato che già con altre metodiche è certo (non probabile) esso è sostanzialmente inutile, perlomeno da un punto di vista clinico, ed essendo solitamente costoso, è in ultima analisi dannoso per il nostro sistema sanitario e quindi il suo impiego è da evitare, al di

fuori di specifici protocolli di ricerca. Se al contrario il biomarcatore è in grado di farci giungere ad una conclusione clinica (es. diagnostica differenziale, follow-up di recidiva di malattia, *end-point* surrogato di indice clinico) in maniera più rapida ed economica offrendoci un dato che precede quello ottenuto con le metodiche tradizionali, allora esso è “virtuoso”, utile al clinico ed il suo impiego può far risparmiare risorse e soprattutto tempo al sistema sanitario nel suo complesso, ma specialmente ai pazienti.

Nel trattare l'argomento del valore clinico dei biomarcatori, dobbiamo anche considerare la “storia naturale” di ogni biomarcatore: esso viene solitamente scoperto od individuato in un contesto sperimentale (es. per mezzo di lavori di ricerca di biologia base) e viene in seguito testato nelle varie patologie allo scopo di individuare il suo campo di azione precipuo. Questo processo di transizione dalla ricerca alla clinica è lungo e faticoso. Necessita infatti di molti passaggi: dalla standardizzazione alla validazione della metodica, alla individuazione di valori di riferimento nelle varie popolazioni in studio (es. maschi-femmine, età pediatrica-adulta-senile, fumatori-ex-fumatori-non fumatori), a test clinici in raffronto ad altre metodiche tradizionali, come sopra specificato, allo scopo di mettere a fuoco le proprietà bio-statistiche del biomarcatore nell'appropriato contesto clinico. Non sorprende, date le difficoltà insite in ciascuno dei passaggi ora menzionati, che molti biomarcatori entusiasticamente candidati ad un largo impiego clinico in realtà siano rimasti delle speranze non avveratesi, o meglio che la loro individuazione, per vari motivi, non abbia portato in seguito ad un impiego clinico praticabile su larga scala.

Questa distinzione tra biomarcatori con valore di ricerca, numerosissimi, e biomarcatori con un valore clinico, presenti in numero limitato, va sempre ricordata in quanto fondamentale per la corretta gestione del dato che ogni biomarcatore apporta nell'ambito di una determinata condizione morbosa.

## Quali sono i substrati da cui identificare i biomarcatori in Pneumologia?

Parlando di biomarcatori in campo respiratorio è però necessario ed utile affrontare l'argomento delle loro “fonti”, cioè la matrice, substrato o campione biologico dal quale sono identificati. A parte le sostanze che sono identificate nel sangue periferico e nell'urina, substrati o liquidi biologici non certo esclusivi della Pneumologia, i biomarcatori respiratori sono isolati o identificati da substrati particolari: il lavaggio broncoalveolare (*bronchoalveolar lavage* – BAL), le biopsie bronchiali, il liquido pleurico e la biopsia pleurica, l'espettorato spontaneo o indotto (*induced sputum* – IS), e l'aria espirata. Questo perché la natura stessa dell'apparato respiratorio rende da un lato necessario e dall'altro problematico la individuazione di biomarcatori il più possibile rappresentativi dei processi biologici che si svolgono al suo interno. La conoscenza delle metodiche di indagine biologica che sono alla base dell'identificazione dell'appropriato biomarcatore rappresenta quindi un necessario prerequisite per la comprensione della natura stessa e delle potenzialità del biomarcatore. Nei capitoli seguenti verranno esaminati in dettaglio due substrati o matrici – IS ed esalato condensato (*exhaled breath condensate* – EBC) – ed un biomarcatore contenuto nell'aria esalata, l'ossido nitrico (NO). Pertanto si rimanda ai suddetti capitoli per una trattazione esaustiva di tali argomenti.

## Quali sono le caratteristiche dei vari substrati?

Interessante è tuttavia il confronto tra le varie metodiche, o meglio tra i vari approcci utilizzati per ottenere biomarcatori in pazienti con malattie respiratorie.

L'evoluzione della storia della medicina, in

questo caso della storia della Pneumologia, ha visto uno sviluppo che si potrebbe definire inusuale. Si è infatti partiti ormai più di 30 anni orsono da studi su substrati ottenuti con metodiche invasive, come ad esempio il BAL<sup>1</sup>, e si è giunti solo nell'ultimo periodo a valutare, ri-valutare od ancor di più scoprire biomarcatori ottenuti con metodiche semi o non invasive, come ad esempio l'IS ed i marcatori nell'aria esalata<sup>2-4</sup>.

Attualmente il BAL è prevalentemente utilizzato nelle pneumopatie diffuse interstiziali mentre i marcatori non-invasivi vengono impiegati maggiormente nelle malattie croniche delle vie aeree, sebbene anche lo screening oncologico e la valutazione dell'esposizione a pneumotossici siano altri importanti capitoli in quest'ambito. Esistono comunque ampie aree di sovrapposizione nello studio sperimentale di diversi biomarcatori su diversi substrati in molte malattie respiratorie, come ad esempio l'impiego dell'IS per valutare i linfociti T nella sarcoidosi o quello del BAL nello studio della BPCO.

Nonostante queste differenze, i diversi substrati hanno almeno un punto in comune: la potenzialità di individuare uno o più biomarcatori utili non solo per favorire le nostre conoscenze patogenetiche, ma anche come ausilio nella gestione clinica dei malati respiratori.

Dal confronto tra le varie metodiche emergono tuttavia alcuni spunti di riflessione (Tab. D). Tutte le metodiche o biomarcatori sono state standardizzate grazie all'opera di *task forces* nate dall'iniziativa di Società Scientifiche, in particolare ERS (*European Respiratory Society*) e ATS (*American Thoracic Society*)<sup>5-10</sup>. In Italia per la verità anche l'AIPO ed il gruppo di Studio Indagini Biologiche ha dato un grosso contributo nella messa a punto metodologica. Anche se l'EBC non ha ancora visto una standardizzazione completa, ciò è facilmente giustificabile dato che è l'ultimo nato nel suo genere. Dalla standardizzazione derivano o fanno parte gli studi

di riproducibilità e validazione. La natura del campione biologico o substrato è ovviamente diversa: liquida per BAL, IS e EBC (in realtà BAL ed IS contengono cellule, a differenza di EBC che contiene solo mediatori ed altre sostanze chimiche), gassosa per NO. I biomarcatori con valore clinico riconosciuto, nonostante ne siano stati proposti molti, sono in realtà in numero molto limitato. Per il BAL la conta cellulare differenziale è considerata necessaria nella diagnostica delle *interstitial lung diseases* (ILDs), come riconosciuto dalle Linee Guida dell'*idiopathic pulmonary fibrosis* (IPF) e della sarcoidosi<sup>11-13</sup>. Oltre a tale applicazione (o biomarcatore) in altre situazioni patologiche rare ma almeno culturalmente rilevanti, come la istiocitosi X, la asbestosi, le polmoniti eosinofile, le sindromi alveolari emorragiche ed altre ancora più rare, il BAL è in grado di offrire la possibilità di individuare biomarcatori cosiddetti "specializzati" cioè esclusivi di tali patologie e quindi diagnostici di per sé. Non hanno invece raggiunto un'utilità clinica o comunque una applicazione che vada al di là di studi focalizzati sulle alterazioni infiammatorie e patogenetiche di alcune malattie respiratorie, tutti i numerosi componenti non cellulari (mediatori infiammatori, citochine, enzimi, etc.) contenuti nel sovranatante del BAL. Uno dei problemi principali in tal senso è senza dubbio quello del fattore di diluizione sconosciuto, che non permette di quantificare in maniera comparabile tra le varie casistiche o tra soggetto e soggetto la presenza e la concentrazione di un determinato componente. Tanto è poco risolvibile tale problema, problema che tuttavia il BAL condivide con l'IS e l'EBC, che anche le Linee Guida ERS<sup>7</sup> sulle componenti acellulari consigliano di esprimere la concentrazione di ogni soluto/mL di sovranatante, tralasciando ogni considerazione su coefficienti di diluizione tra i diversi campioni ottenuti nei diversi esami. Similmente, la applicazione del BAL in alte patologie infiammatorie, come asma



**Tabella I. Confronto tra lavaggio broncoalveolare (BAL), espettorato indotto (IS), ossido nitrico (NO), ed esalato condensato (EBC). Applicazioni cliniche nelle malattie respiratorie infiammatorie.**

|  | BAL   | IS   | NO   | EBC  |
|--|---|--|--|--|
| <b>Standardizzazione</b>                                 | ERS 1989, 1992, 1999 <sup>5-7</sup>   | ERS 2002 <sup>8</sup>  | ATS/ERS 2005 <sup>9</sup>  | ATS/ERS 2005 <sup>10</sup>   |
| <b>Riproducibilità e Validazione</b>                     | Riproducibilità determinata e metodologia validata in soggetti normali e malati (specie in ILDS)              | Riproducibilità determinata e metodologia validata in soggetti normali e malati (specie in asma e BPCO)                                      | Riproducibilità determinata e metodologia validata in soggetti normali e malati (asma) | Dati disponibili solo per alcuni mediatori/sostanze                          |
| <b>Natura del substrato</b>                              | Fluido biologico contenente cellule e sostanze acellulari   | Fluido biologico contenente cellule e sostanze acellulari  | Aria esalata contenente il gas NO  | Fluido biologico contenente sostanze acellulari                              |
| <b>Biomarcatori</b>                                      | Conta cellulare differenziale e marcatori specializzati *   | Conta cellulare totale e differenziale e marcatori specializzati *   | NO ppb   | pH, vari mediatori   |
| <b>Fattibilità: strutture ed attrezzature necessarie</b> | Endoscopia toracica, laboratorio di citologia di base, convenzioni con altri laboratori per esami particolari | Fisiopatologia respiratoria, aerosol ad ultrasuoni, laboratorio di citologia di base, convenzioni con altri laboratori per esami particolari | Analizzatore di NO nell'aria esalata   | Condensatore di EBC pHmetro, ulteriori analisi (HPLC o SM)                   |
| <b>Tempo necessario per l'analisi</b>                    | 1 giorno lavorativo **  | 1 giorno lavorativo **   | On line  | On line ***, Giorni o settimane  |
| <b>Principale campo di applicazione ****</b>             | ILDs<br>Esposizione a sostanze tossiche   | Malattie delle vie aeree, ILDS, esposizione a sostanze tossiche  | Asma and malattie allergiche   | Proposto in BPCO, asma, allergie, infezioni, esposizione a sostanze tossiche |
| <b>Impiego Clinico</b>                                   | Nel processo diagnostico della sarcoidosi, IPF ed altre ILDS <sup>11-13</sup>                                 | Come ausilio nella gestione dell'asma <sup>14-18</sup>   | Come ausilio nella gestione dell'asma <sup>19-22</sup>                                 | NA   |

\* Marcatori specializzati possono essere diagnostici nel BAL (es. cellule CD1+ nella Istiocitosi X, analisi mineralogiche) e nell'IS (es. corpi dell'asbesto).

\*\* Un'ora e mezzo è solitamente sufficiente ad un team esperto per avere il risultato, un giorno lavorativo si intende per un referto necessario alla pratica clinica.

\*\*\* La valutazione on line nell'EBC è solo per la determinazione del pH.

\*\*\*\* Solo le applicazioni connesse ai marcatori infiammatori nel polmone e nelle vie aeree di pazienti adulti.

ILDs: *interstitial lung diseases*; IPF: *idiopathic pulmonary fibrosis*; HPLC: *high performance liquid chromatography*; SM: *spettrografia di massa*.

Riprodotto con permesso da *European Respiratory Society Journals Ltd*: Balbi B, Pignatti P, Corradi M, et al. *Bronchoalveolar lavage, sputum and exhaled clinically relevant inflammatory markers: values in healthy adults*. Eur Respir J 2007;30:769-81.

e BPCO, pur avendo un interesse legato all'approfondimento di temi di ricerca biologica e patogenetica, non riveste attualmente alcun ruolo da un punto di vista clinico.

Per l'IS la conta cellulare totale ma soprattutto la proporzione degli eosinofili, a parte alcuni marcatori "specializzati" in analogia con il BAL, è il biomarcatore a cui è stata riconosciuto un valore clinico nella diagnostica ed ora anche nella gestione clinica dell'asma<sup>14-18</sup>. Anche la determinazione di NO nell'aria esalata ha acquisito simile valore nella gestione dell'asma<sup>19-22</sup>, mentre per l'EBC non vi sono ancora biomarcatori proposti come utili da un punto di vista clinico, ove si escludano i marcatori di esposizione a determinate sostanze tossiche, utili nelle applicazioni in Medicina del Lavoro<sup>23</sup>.

Un altro aspetto da tenere presente è il dispendio di risorse umane e finanziarie necessarie per ottenere i diversi biomarcatori. Mentre il BAL presuppone che sia a disposizione una sezione di endoscopia toracica ed un laboratorio di citologia di base, per l'IS è necessario dotarsi di un aerosol e di un laboratorio di citologia di base, per NO di un rilevatore di NO e per l'EBC di un condensatore. Per l'EBC, tuttavia, tale facilità di campionamento contrasta con la difficoltà ad esaminare il campione, a parte forse la determinazione del pH e dell' $H_2O_2$ , poiché l'analisi dell'EBC, ad es. la determinazione di composti chimici prodotti di ossidazione o nistrossidazione, necessita di metodiche molto sensibili, costose e quindi a disposizione solo di alcuni laboratori. Tutto ciò riduce la fruibilità, almeno allo stato attuale, del dato ottenuto dall'EBC, specialmente a scopo clinico. Il tempo necessario per avere a disposizione il dato del biomarcatore varia da praticamente nessun intervallo di tempo per la valutazione on-line di NO, ad un giorno lavorativo (BAL ed espettorato), fino a vari giorni (sempre escluso il pH) per l'EBC o per alcune analisi sofisticate su BAL o IS. Allo scopo di meglio precisare i compari-

menti dell'apparato respiratorio che vengono campionati con le diverse metodiche (es. alte o basse vie aeree), particolarmente utili possono risultare gli studi comparativi. In essi le stesse popolazioni di soggetti sani e/o malati viene sottoposta a più di un campionamento (es. analisi di IS ed EBC o di BAL ed EBC)<sup>24-26</sup>.

Infine, va ricordato che non vi è uniformità nella quantità di dati in letteratura sui valori di riferimento ottenuti in soggetti normali tra le varie metodiche. Questo è dovuto almeno in parte alla fase "storica" in cui si trovano i diversi substrati o biomarcatori, per cui ad esempio il BAL vede un gran numero di studi disegnati allo scopo di ottenere valori di riferimento, mentre i più recenti studi sull'aria esalata hanno molto meno dati simili<sup>27</sup>. Ciò comunque rappresenta una lacuna che, specie per l'EBC andrà colmata nei prossimi anni.

## PUNTI CHIAVE

- I biomarcatori sono in uso in Pneumologia da molto tempo ma recentemente vi sono stati molti progressi sia nella comprensione dei meccanismi di base che nelle metodiche in uso per ottenerli.
- Ogni biomarcatore va validato, standardizzato e testato nelle varie patologie.
- Il valore dei biomarcatori può essere legato ad aspetti di ricerca od ad aspetti clinici. In quest'ultimo caso un buon biomarcatore deve fornire un dato aggiuntivo rispetto a quelli ottenibili con metodiche tradizionali.
- In Pneumologia esistono biomarcatori ottenuti con metodiche invasive (es. BAL) o non invasive (es. espettorato indotto, marcatori nell'aria esalata).
- Il confronto tra le varie metodiche mette in luce alcuni aspetti comuni, ma anche alcune differenze, specie nel campo di azione specifico per ogni metodica, nel costo, e nella sua fruibilità.

**Bibliografia**

- <sup>1</sup> Reynolds HY, Newball HH. *Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage*. J Lab Clin Med 1974;84:559-73.
- <sup>2</sup> Wooten OJ, Dulfano MJ. *Improved homogenization techniques for sputum cytology counts*. Ann Allergy 1978;41:150-4.
- <sup>3</sup> Gustaffson LE, Leone AM, Persson MG, et al. *Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans*. Biochem Biophys Res Commun 1991;181:852-7.
- <sup>4</sup> Sidorenko GI, Zborovskii EI, Levina DI. *Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function)*. Ter Arkh 1980;52:65-8.
- <sup>5</sup> Klech H, Pohl W. *Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL): report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL*. Eur Respir J 1989;2:561-85.
- <sup>6</sup> Klech H, Hutter C, Costabel U. *Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL*. Eur Respir Rev 1992; 2:47-127.
- <sup>7</sup> Haslam PL, Baughmann RP. *Guidelines for measurement of acellular components and recommendations for standardization of bronchoalveolar lavage (BAL)*. Eur Respir Rev 1999;9:66.
- <sup>8</sup> Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, et al. *Standardised methodology of sputum induction and processing*. Eur Resp J 2002;20(Suppl. 37):1S-55S.
- <sup>9</sup> *ATS/ERS Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide*. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:912-30.
- <sup>10</sup> Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. *Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions*. Eur Respir J 2005;26:523-48.
- <sup>11</sup> Reynolds HY. *Use of bronchoalveolar lavage in humans – past necessity and future imperative*. Lung 2000;178:271-93.
- <sup>12</sup> American Thoracic Society. *Statement on Sarcoidosis*. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:736-55.
- <sup>13</sup> American Thoracic Society. *Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and therapy. International Consensus Statement*. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:646-64.
- <sup>14</sup> Hunter CJ, Brightling CE, Woltmann G, et al. *A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma*. Chest 2002;121:1051-7.
- <sup>15</sup> Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. *Asthma exacerbations and sputum eosinophils counts: a randomized controlled trial*. Lancet 2002;360:1715-21.
- <sup>16</sup> Jayaram L, Parameswaran K, Sears MR, et al. *Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice*. Eur Respir J 2000;16:150-8. Erratum in: Eur Respir J 2000;16:1029.
- <sup>17</sup> Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, et al. *Clinical applications of assessment of airway inflammation using induced sputum*. Eur Respir J Suppl 2002;37:40S-3S.
- <sup>18</sup> Brightling CE. *Clinical applications of induced sputum*. Chest 2006;129:1344-8.
- <sup>19</sup> Deykin A, Massaro AF, Drazen JM, et al. *Exhaled nitric oxide as a diagnostic test for asthma: online versus offline techniques and effect of flow rate*. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1597-601.
- <sup>20</sup> Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. *Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma*. NEJM 2005;352:2163-73.
- <sup>21</sup> Taylor Dr, Pijnenburg MW, Smith AD, et al. *Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation*. Thorax 2006;61:817-27.
- <sup>22</sup> Kharitonov SA, Barnes PJ. *Exhaled biomarkers*. Chest 2006;130:1541-6.
- <sup>23</sup> Goldoni M, Catalani S, De Palma G, et al. *Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten*. Environ Health Perspect 2004;112:1293-8.
- <sup>24</sup> Corradi M, Pignatti PG, Goldoni M, et al. *Comparison between exhaled and bronchoalveolar lavage levels of hydrogen peroxide in patients with diffuse interstitial lung diseases*. Eur Respir J 2006; 28(Suppl. 50):828S.
- <sup>25</sup> Jackson AS, Sandrini A, Campbell C, et al. *Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage*. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:222-7.
- <sup>26</sup> Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, et al. *Pulmonary biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Am J Respir Crit Care Med 2006;174:6-14.
- <sup>27</sup> Balbi B, Pignatti P, Corradi M, et al. *BAL, sputum and exhaled clinically relevant inflammatory markers: values in healthy adults*. ERJ 2007;30:769-81.

## BIOMARKERS NELL'ESPETTORATO INDOTTO

**Antonio Spanevello**

*Dipartimento di Scienze Mediche e del Lavoro, Sezione Malattie dell'Apparato Respiratorio, Università di Foggia, Fondazione S. Maugeri, I.R.C.C.S., Cassano delle Murge (BA)*

### Introduzione

In passato l'infiammazione delle vie aeree è stata studiata attraverso l'analisi di secrezioni bronchiali e biopsie ottenute mediante l'utilizzo di indagini endoscopiche, metodiche che non possono essere considerate d'elezione in un monitoraggio a lungo termine a causa della loro estrema invasività e scarsa ripetibilità. Recentemente vi è stato un crescente interesse su tecniche meno invasive che permettono di ottenere informazioni dirette ed indirette sull'eventuale presenza e sull'entità della flogosi bronchiale, in grado, così, di agevolare la diagnostica ed, in particolare, di monitorare nel tempo l'evoluzione della patologia. *Markers* cellulari, biochimici, immunologici e molecolari dell'infiammazione delle vie aeree possono essere studiati attraverso metodiche non invasive, quali la ricerca di eosinofili ed ECP (proteina cationica eosinofila) nel sangue, la determinazione di *markers* urinari (proteina X eosinofila) (EPX), l'analisi dei gas espirati e dell'espettorato indotto. Quest'ultimo per i numerosi risvolti pratici e le potenziali applicazioni cliniche sembra costituire una vera e propria promessa per il futuro.

### Razionale per l'utilizzo dell'espettorato indotto

*Definizione.* L'espettorato è definito come una secrezione delle vie aeree, prevalentemente composto da costituenti solubili e da una componente cellulare <sup>1</sup>.

*Storia.* Proposta come utile strumento investigativo per la ricerca e la valutazione del processo infiammatorio bronchiale, l'analisi dell'espettorato nelle malattie respiratorie, descritta dettagliatamente fin dal 1992 <sup>2</sup>, è stata messa inizialmente in discussione a causa della difficoltà di ottenere un campione adeguato. Tuttavia, si è imposta negli ultimi 15-20 anni, anche grazie al superamento di tale problema, attraverso lo sviluppo ed utilizzo della metodica di induzione. È attualmente considerata come una tecnica non invasiva capace di fornire informazioni dirette circa il grado di infiammazioni delle vie aeree con alta potenzialità di applicazioni clinica.

*Razionale per l'utilizzo dell'espettorato.* L'infiammazione delle vie aeree gioca un ruolo fondamentale nelle patologie respiratorie. Il perdurare dell'infiammazione può causare mutamenti strutturali irreversibili quali danni epiteliali, ispessimento della membrana basale, aumento della vascola-

rizzazione, proliferazione dei miofibroblasti ed ipertrofia ed iperplasia del muscolo liscio<sup>3,4</sup>. Valutare la flogosi bronchiale risulta, pertanto, essenziale sia per lo studio dei meccanismi patofisiologici alla base della patologia respiratoria sia relativamente alla sua evoluzione e monitoraggio clinico<sup>5</sup>. La presenza ed il tipo di infiammazione delle vie aeree può essere difficile da rilevare clinicamente, a questo proposito si è rivelato estremamente vantaggioso l'utilizzo di *markers* di infiammazione bronchiale per il loro potenziale ruolo nella diagnostica, controllo e trattamento delle patologie respiratorie. In passato e fino a qualche anno fa la flogosi bronchiale è stata studiata attraverso l'analisi di secrezioni ottenute mediante metodi broncoscopici diretti, altamente invasivi e poco ripetibili quali la biopsia bronchiale, il lavaggio bronchiale (BW) o broncoalveolare (BAL), o attraverso misure indirette di sintomi, esami spirometrici, monitoraggio del picco di flusso espiratorio, test di iperreattività bronchiale o *markers* infiammatori nel sangue periferico; metodiche queste ultime meno invasive ma sicuramente meno specifiche rispetto alle prime e pertanto scarsamente correlabili con le stesse<sup>6</sup>. Negli ultimi anni è andata evolvendo una metodica diretta e relativamente non invasiva con caratteristiche di validità e riproducibilità basata, appunto,

sull'analisi dell'espettorato indotto (IS), sullo studio della sua composizione cellulare e dei costituenti solubili per la valutazione della flogosi bronchiale<sup>2,7,8</sup>. I risultati ottenuti con questa metodica correlano meglio con quelli ottenuti nel BW rispetto a quelli ottenuti con la Biopsia Bronchiale o il BAL. Ciò è comprensibile se si considera la provenienza del materiale biologico analizzato che riflette, appunto, la diversità della risposta infiammatoria delle differenti aree delle vie aeree. Infatti, l'IS ed il BW analizzano secrezioni provenienti dal lume delle vie aeree più centrali, il BAL dal lume più periferico e le biopsie bronchiali dalle pareti delle vie aeree più centrali. L'eosinofilia presente nell'espettorato è più sensibile e specifica nel diagnosticare la presenza di asma rispetto all'eosinofilia presente nel sangue periferico o all'ECP nel siero<sup>9</sup>, o a tecniche più recenti quali l'analisi dei gas espirati, (come ad es. la misura dell'ossido nitrico esalato (eNO))<sup>10</sup>. L'eosinofilia nell'espettorato, inoltre, è più sensibile, grazie all'incremento della quota eosinofila, ai cambiamenti clinici e risponde più velocemente al trattamento rispetto ad altre metodiche<sup>11</sup>. Pertanto, non stupisce che tale tecnica, per i suoi innumerevoli risvolti pratici e le potenziali applicazioni cliniche, sia in grado di aumentare la potenzialità diagnostica per le diverse patologie bronchiali<sup>12</sup>.

**Tabella I. Utilità della misura dei markers di infiammazione bronchiale nell'espettorato indotto.**

|   |  |
|---|--|
| <b>Come misura complementare per la diagnosi e le valutazioni</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nel confermare la diagnosi</li> <li>- Correlata ai sintomi e alla funzione polmonare</li> <li>- Informazioni aggiuntive nella valutazione di severità</li> </ul>  |
| <b>Come indicatore di efficacia della terapia di asma e BPCO</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibile agli effetti dei corticosteroidi inalatori (CSI) e degli antileucotrieni</li> <li>- Può svelare una infiammazione subclinica delle vie aeree</li> </ul> |
| <b>Come predittore di scarso controllo</b>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Negli soggetti instabili</li> <li>- Nei soggetti con scarsa compliance</li> <li>- Prima di ridurre o sospendere la terapia</li> </ul>                             |

## La metodica d'induzione e l'analisi cellulare

### Induzione

La tecnica consiste nell'inalazione di un aerosol di soluzione salina ipertonica mediante l'utilizzo di un nebulizzatore ultrasonico, a concentrazione costante (NaCl 3%, NaCl 4,5%) o in concentrazioni progressivamente crescenti (NaCl 3%, 4%, 5%), ad intervalli regolari che possono variare da 5 a 7 minuti<sup>2</sup>. A questo proposito è stato dimostrato che diverse concentrazioni di soluzione ipertonica (3-5%) non influenzano la conta cellulare differenziale del campione di espettorato<sup>13</sup>, così come non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa nella composizione cellulare tra campioni ottenuti ad intervalli regolari di durata diversa durante il processo di induzione<sup>14</sup>. Gli intervalli tra un'inalazione e l'altra nel processo induttivo permettono al soggetto di espettorare e di eseguire una spirometria di controllo. Infatti, ad ogni intervallo, o in caso si manifestino sintomi di ostruzione bronchiale, viene monitorata la funzione polmonare con la misura di indicatori di base quali il FEV<sub>1</sub> (volume espiratorio forzato in 1 sec) e la FVC (capacità vitale)<sup>15</sup>. È indicata la sospensione dell'induzione se vi è un calo del FEV<sub>1</sub> superiore al 20% rispetto al valore basale, o se compare dispnea<sup>16</sup>. L'induzione è solitamente preceduta da assunzione di un broncodilatatore per via inalatoria (Salbutamolo 200 µg), infatti, è stato dimostrato che il pretrattamento con un β<sub>2</sub> agonista non altera la conta cellulare, oltre a prevenire la potenziale ostruzione dovuta all'inalazione di soluzione salina<sup>13</sup>. Dopo opportuni accorgimenti, onde evitare contaminazione salivare al soggetto è chiesto di espettorare in un apposito contenitore. Un campione del peso non inferiore ai 70 mg è preferibile per una buona processazione<sup>8</sup>.

### Analisi cellulare

Una volta che l'espettorato è stato opportunamente disciolto si può procedere alla conta cellulare e sviluppare metodi immunocitochimici o citofluorimetrici. Possono essere misurati *markers* infiammatori quali ad esempio eosinofili, neutrofilo e mediatori solubili quali l'ECP, l'istamina, la triptasi possono essere misurati<sup>12</sup>. La tecnica dell'analisi dell'espettorato ha subito negli ultimi anni una notevole evoluzione, attualmente sono disponibili due metodi di processazione dell'espettorato: il primo, in cui si utilizza il campione intero di espettorato, il secondo basato sulla selezione della parte più vischiosa prodotta dal soggetto (metodo del *plug*), evitando così la contaminazione salivare. In quest'ultimo caso, la porzione selezionata, dopo essere stata pesata, viene unita al diittiotreitolo per disperdere le cellule ed omogeneizzare il tutto. I campioni ottenuti, per essere attendibili e quindi non inquinati dal materiale sopraglottideo non devono presentare più del 20% di cellule squamose ed avere una vitalità > 50%<sup>13</sup>. Nel caso in cui, invece, si utilizza il campione intero, anch'esso omogeneizzato con diittiotreitolo, l'inquinamento salivare è comprensibilmente maggiore. Recentemente è stato dimostrato che queste due metodiche sono da considerarsi entrambe valide, in quanto in grado di distinguere i casi patologici dai controlli sani, anche se il metodo del *plug* presenta una concentrazione maggiore di eosinofili e di ECP rispetto alla metodica che utilizza l'intero campione di espettorato ottenuto<sup>17</sup>.

### Riproducibilità e valori di normalità

La conta cellulare differenziale dei citocentrifugati di espettorato, dopo trattamento dei campioni con la metodologia precedentemente descritta, e la misura dei mediatori hanno presentato una buona riproducibilità

tra osservatori <sup>8,18</sup>, tra campioni dello stesso soggetto ottenuti in due giorni diversi in una fase di stabilità della malattia <sup>8,18,19</sup> ed all'interno dello stesso campione <sup>18</sup>.

Sono, inoltre, stati pubblicati dei valori di riferimento per la popolazione adulta <sup>20</sup>. In particolare, uno studio multicentrico su un campione di numerosità adeguata di soggetti di varie fasce di età ha permesso di acquisire dati circa i valori di normalità dell'espettorato mettendo in evidenza come nella popolazione normale la quota di cellule infiammatorie quali ad es. gli eosinofili non supera mai il 3% mentre una maggiore variabilità si osserva nella linea dei neutrofili e dei macrofagi <sup>21</sup>.

### **Applicazioni cliniche dell'espettorato indotto**

Le principali malattie delle vie aeree quali l'asma bronchiale, la broncopneumopatia critica ostruttiva (BPCO) o altre condizioni patologiche respiratorie sono definite come caratterizzate da una tipica sintomatologia e da anomalie della fisiologia delle vie aeree, anche se è unanimemente riconosciuto un ruolo centrale alla flogosi bronchiale, quale caratteristica comune alle stesse patologie <sup>22</sup>. Sebbene la valutazione della funzione polmonare sia un pre-requisito fondamentale per la diagnosi di tali patologie, la valutazione della flogosi bronchiale non viene eseguita di routine. Come accennato precedentemente, sono disponibili numerose tecniche che spaziano dall'analisi dei Gas Esalati alla conta cellulare differenziale ed alla stima delle concentrazioni dei vari mediatori nell'escreato indotto <sup>23</sup>. In particolare, l'applicazione della tecnica dell'espettorato indotto in una vasta gamma di malattie dell'apparato respiratorio e in un ampio spettro di severità della patologia in esame ha fornito una spinta verso la ricerca di una relazione tra

la funzione polmonare e lo stato di flogosi bronchiale, portando all'identificazione di fenotipi della malattia e del loro grado di risposta alle attuali terapie. In tale contesto, grazie anche alle sue evidenti potenzialità si è rivelata in grado di fornire uno strumento di elevato valore clinico nella gestione delle più comuni patologie respiratorie <sup>22</sup>.

### **Broncopneumopatia cronica ostruttiva**

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è una sindrome infiammatoria cronica del polmone, tale infiammazione cronica interessa le vie aeree, il parenchima polmonare ed i vasi polmonari. Le caratteristiche cellulari e molecolari e l'entità della flogosi variano in relazione alla progressione della malattia. Con il tempo il processo infiammatorio cronico danneggia il polmone determinando le alterazioni anatomiche patologiche caratteristiche della patologia (rimodellamento, ostruzione delle piccole vie aeree, distruzione del parenchima polmonare) <sup>23</sup>. Altra conseguenza attribuibile all'infiammazione cronica è rappresentata dallo squilibrio del sistema proteasi/anti-proteasi. La proteasi, come l'elastasi, sono enzimi proteolitici capaci di degradare le componenti del tessuto connettivo polmonare, in particolare l'elastina. L'attività delle proteasi è antagonizzata dalle antiproteasi ed in particolare dall' $\alpha$ 1-antitripsina, uno dei principali inibitori specifici, che con la sua azione protegge i polmoni dall'attività di queste sostanze. Fattori, presumibilmente legati al fumo di sigaretta, sono responsabili dello squilibrio del sistema proteasi/antiproteasi nella maggior parte dei soggetti BPCO; infatti, il fumo di sigaretta causa il richiamo e l'attivazione di cellule infiammatorie, in particolare macrofagi e neutrofili, che secernono proteasi quali l'elastasi neutrofila e la

**Tabella II.** *Elenco di alcuni dei principali costituenti cellulari o mediatori solubili misurabili nell'espettorato indotto.*

| <b>Patologia</b>                             | <b>Markers di infiammazione</b>  |
|--|--|
| <b>BPCO</b>                                  | <p><b>Cellule:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- neutrofilii</li> <li>- macrofagi</li> <li>- eosinofili</li> </ul> <p><b>Mediatori:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- leucotriene B4 (LTB4)</li> <li>- intereuchina 8 (IL-8)</li> <li>- tumor <i>necrosis factor</i> (TNF-<math>\alpha</math>)</li> <li>- fattore stimolante la formazione di colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF)</li> <li>- endotelina-1 (ET-1)</li> <li>- neuropeptidi: sostanza P (SP)</li> </ul>             |
| <b>Asma</b>                                  | <p><b>Cellule:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- eosinofili</li> <li>- mastociti</li> <li>- neutrofilii</li> <li>- macrofagi</li> </ul> <p><b>Mediatori:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- proteina cationica eosinofila</li> <li>- mieloperoxidasi (mpo)</li> <li>- tritasi</li> <li>- interleuchina-5</li> <li>- albumina, il fibrinogeno</li> <li>- alfa2-macroglobulina</li> <li>- cisteinil-leucotrieni (cys-LT)</li> <li>- prostaglandine (PGD2)</li> <li>- thromboxane</li> </ul> |
| <b>Tosse</b>                                 | <p><b>Cellule:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>neutrofilii</i></li> <li>- <i>eosinofili</i></li> </ul>   |
| <b>Patologie interstiziali/professionali</b> | <p><b>Cellule:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>neutrofilii</i></li> <li>- <i>eosinofili</i></li> <li>- <i>linfociti CD4</i></li> <li>- <i>linfociti CD8</i></li> </ul> <p><b>Mediatori:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>interleuchina-8 (IL-8)</i></li> <li>- <i>metalloproteinasi-9</i></li> </ul>  |



metalloproteasi di matrice capaci di degradare il tessuto polmonare<sup>23 24</sup>.

La BPCO, dunque, è caratterizzata da un aumento di neutrofili, macrofagi e linfociti T (per lo più linfociti T CD8+) in varie parti del polmone. In alcuni soggetti è presente un aumento degli eosinofili, in particolare durante una riacutizzazione. Tale incremento dell'attività cellulare è determinato da un aumento delle cellule infiammatorie, della loro sopravvivenza e/o della loro attivazione<sup>23</sup>. In dettaglio:

**Neutrofili.** Nella BPCO il conteggio dei neutrofili nell'espettorato risulta comunemente aumentato ed è correlato significativamente al FEV<sub>1</sub> ed all'incremento della velocità nel declino dello stesso nel tempo, sottolineando così l'importanza funzionale dell'infiammazione neutrofila in tale patologia<sup>25</sup>. Inoltre, studi condotti sull'espettorato indotto hanno mostrato un incremento della mieloperossidasi (MPO) e della lipocaina umana neutrofila, entrambi indici di attivazione neutrofila. Questi neutrofili secernono diverse proteinasi, tra cui l'elastasi neutrofila, la catepsina G neutrofila e la proteinasi 3 neutrofila, che possono contribuire alla distruzione parenchimale e all'ipersecrezione cronica di muco<sup>23 26</sup>. Le attuali terapie per la BPCO hanno un effetto limitato sull'infiammazione neutrofila. L'espettorato indotto fornisce un eccellente strumento di ricerca per valutare l'effetto di terapie sperimentali sull'infiammazione neutrofila ed è probabile che in futuro questa tecnica possa permettere di dirigere, non solo, terapie mirate contro la componente eosinofila, ma permetterà allo specialista pneumologo di disegnare uno specifico trattamento per quei soggetti con una infiammazione neutrofila predominante<sup>22</sup>.

**Macrofagi.** Recenti studi sull'espettorato indotto hanno evidenziato, nelle piccole e grandi vie aeree e nel parenchima polmonare di Bronchitici Cronici un aumento di macrofagi<sup>27 28</sup>. Queste cellule che in corso di

BPCO sono probabilmente in grado di concertare l'infiammazione, una volta attivate producono il fattore di necrosi tumorale (*tumor necrosis factor- $\alpha$*  – TNF- $\alpha$ ), l'interleuchina-8 (IL-8) ed il leucotriene B4 (LTB4), i quali sono responsabili dell'infiammazione neutrofila<sup>23</sup>.

**Linfociti T.** Cellule linfocitarie, per la maggior parte linfociti T CD8+ risultano aumentate nell'espettorato di soggetti BPCO<sup>29</sup>. Anche se non è ancora completamente chiaro il loro ruolo nella flogosi della patologia bronchitica si suppone che essi possano agire attraverso il rilascio di alcuni mediatori determinando citolisi ed apoptosi delle cellule epiteliali alveolari, le quali possono essere responsabili della persistenza dell'infiammazione<sup>23</sup>.

**Eosinofili.** Non è stata ancora completamente definita la presenza ed il ruolo degli eosinofili nella BPCO. Alcuni studi hanno evidenziato la presenza di tali cellule nell'espettorato indotto di pazienti con BPCO stabile, riscontrando che in circa il 40% di tali soggetti presenta un conteggio di eosinofili superiore al 3%<sup>30 31</sup>. Questi soggetti non sono distinguibili dai soggetti che non presentano escreteo eosinofilo sulla base di caratteristiche cliniche o della funzionalità polmonare. Sono stati, poi, osservati elevati livelli di ECP e di perossidasi eosinofila (EPO) nell'espettorato indotto in soggetti bronchitici cronici, il che suggerisce che gli eosinofili possano essere presenti ma degranulati e quindi non più riconoscibili al microscopio ottico<sup>26</sup>. Inoltre, gli elevati livelli di elastasi neutrofila (NE) in corso di BPCO possono essere responsabili della degranulazione eosinofila<sup>23</sup>. Un elevato numero di studi dimostra, invece, un significativo aumento degli eosinofili nelle vie aeree durante una riacutizzazione<sup>32 33</sup>.

Vi è, infine, una concreta evidenza che la presenza di eosinofili nell'espettorato sia in

grado di predire nei pazienti con BPCO una risposta obiettiva al trattamento con corticosteroidi orali<sup>30,31</sup> o inalatori<sup>34</sup>. Infatti, è stato osservato che la risposta, dopo due settimane di somministrazione di prednisolone orale, determina una caduta significativa del conteggio degli eosinofili nell'espettorato, senza alcuna variazione nella quota neutrofila. Questo indica che l'infiammazione eosinofila delle vie aeree sia funzionalmente importante in alcuni soggetti con BPCO e che gli effetti benefici dei corticosteroidi siano dovuti alla modificazione di tale aspetto all'interno del complesso quadro infiammatorio a livello delle vie aeree<sup>22</sup>. Potenzialmente lo studio dell'espettorato potrebbe essere utilizzato come un test di screening per guidare l'indicazione in soggetti BPCO all'utilizzo del corticosteroide a lungo termine.

#### **Principali mediatori dell'infiammazione.**

Anche se resta ancora in parte inesplorato il campo delle specifiche funzioni dei mediatori di infiammazione nella BPCO, sappiamo che le cellule infiammatorie attivate rilasciano molteplici tipi di mediatori, i quali comprendono una serie di proteinasi, ossidanti e peptici tossici. Molti mediatori dell'infiammazione, compresi il LTB<sub>4</sub>, l'IL-8 ed il TNF- $\alpha$ , sono in grado di danneggiare le strutture polmonari e/o di mantenere la flogosi neutrofila. Il danno determinato da tali mediatori può ulteriormente potenziare la flogosi attraverso il rilascio di peptici, dotati di azione chemiotattica, da parte della matrice extracellulare. Studi sull'utilizzo a scopo terapeutico di antagonisti di alcuni di questi mediatori potrebbe essere auspicabili per una migliore gestione della patologia<sup>23</sup>.

**Leucotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>).** L'LTB<sub>4</sub>, un potente fattore chemiotattico per i neutrofilii, è presente ad elevate concentrazioni nell'espettorato indotto dei pazienti con BPCO. Questo è probabilmente sintetizzato dai macrofagi alveolari, i quali rilasciano più LTB<sub>4</sub>

in soggetti con patologia bronchitica rispetto a soggetti sani<sup>35</sup>.

**Interleuchina 8 (IL-8).** L'IL-8, fattore chemiotattico selettivo per i neutrofilii, può essere rilasciato dai macrofagi, dai neutrofilii e dalle cellule dell'epitelio bronchiale, è presente in elevate concentrazioni nell'espettorato indotto di pazienti Bronchitici Cronici<sup>36, 37, 38</sup>. In tali soggetti l'IL-8 può rivestire un ruolo primario nell'attivazione di neutrofilii ed eosinofili nelle loro vie aeree, rivelandosi, così, un utile marcatore nella valutazione del grado di infiammazione bronchiale<sup>38</sup>.

**Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).** Il TNF- $\alpha$ , presente in elevate concentrazioni nell'espettorato di pazienti BPCO<sup>36</sup>, attiva il fattore di trascrizione nucleare  $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B), che a sua volta attiva il gene dell'IL-8 nelle cellule epiteliali e nei macrofagi. I livelli sierici di TNF- $\alpha$  sono aumentati nei pazienti affetti da BPCO con importante calo ponderale. Questo dato fa pensare che questo mediatore possa giocare un ruolo nella cachessia presente in soggetti con BPCO grave<sup>23</sup>.

**Fattore stimolante la formazione di colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF).** Il GM-CSF è una molecola importante per la sopravvivenza dei neutrofilii e può avere un ruolo nell'intensificare la flogosi neutrofila; un elevato numero di macrofagi immunoreattivi nei confronti di tale molecola è presente nell'espettorato dei soggetti BPCO<sup>39</sup>.

**Endotelina-1 (ET-1).** L'endotelina-1 è un potente vasocostrittore di origine endoteliale che si trova in elevata concentrazione nell'espettorato indotto di pazienti Bronchitici Cronici<sup>40</sup>.

**Neuropeptidi – sostanza P (SP).** Il peptide correlato al gene per la calcitonina, ed il peptide intestinale vasoattivo (VIP) hanno importanti effetti sui vasi e sulla secrezione mucosa. Un'aumentata secrezione di sostanza P si osserva nell'espettorato di soggetti con bronchite cronica<sup>41</sup>.

## Asma

L'identificatore patologico dell'asma è comunemente rappresentato dall'infiammazione delle vie aeree, un processo che risulta irregolarmente distribuito lungo tutto l'albero bronchiale ed arriva ad interessare anche le vie aeree periferiche ed il parenchima polmonare<sup>42</sup>. L'infiammazione è spesso caratterizzata dall'innalzamento della quota eosinofila, da un aumentato numero di mastociti, macrofagi e T-linfociti attivati nella mucosa delle vie aeree e nel lume bronchiale, e da alti livelli di citochine e chemochine, (citochine che promuovono il reclutamento delle cellule infiammatorie), coinvolte nel processo infiammatorio, molte delle quali sono individuate come potenziali *markers* infiammatori. Essa, quindi, è dovuta ad una intensa infiltrazione cellulare, guidata da cellule di tipo Th-2 (T-linfociti), e dai relativi prodotti da loro secrete, quali l'ECP e citochine multifunzionali appartenenti al raggruppamento genico dell'interleuchina-4 (IL-4)<sup>43,44</sup>. Le conseguenze dell'infiammazione acuta e cronica sono di fondamentale importanza nella patogenesi dell'asma, in particolare le alterazioni morfologiche che vanno da mutazioni strutturali e funzionali dell'epitelio bronchiale ad un vero e proprio danno epiteliale, spesso evidenti anche nelle forme più lievi della malattia. Alterazioni che portano ad un rimodellamento strutturale del tessuto connettivo<sup>43,44</sup>. Dunque lo studio della flogosi bronchiale, attraverso la valutazione di *markers* biologici, potrebbe far luce su aspetti della patologia asmatica non evidenziabili con le routinarie indagini cliniche, contribuendo così a migliorare la nostra comprensione dei meccanismi patogenetici di fondo, in grado, inoltre, di fornire oltre ad un valido strumento diagnostico, indicazioni atte ad ottimizzare, opportunamente, rendendolo più efficace, l'intervento terapeutico. In dettaglio:

**Eosinofili.** Dal confronto dell'analisi cellulare dell'espettorato proveniente, rispettivamente, da controlli sani e da soggetti asmatici, si riscontra per questi ultimi un incremento della quota eosinofila; in particolare, anche se l'infiammazione eosinofila può manifestarsi in asmatici asintomatici, si osserva più frequentemente in quelli sintomatici. L'utilizzo di un valore di soglia del 2-3% come patologico incremento degli eosinofili nell'espettorato rispetto ai valori caratteristici delle normali vie aeree, ha permesso di introdurre l'eosinofilia nell'espettorato come test diagnostico per la patologia asmatica<sup>8,22</sup>. A questo proposito, nei soggetti asmatici, sia bambini che adulti, la presenza di eosinofili nell'espettorato è un indicatore più sensibile di infiammazione bronchiale dell'incremento dell'eosinofilia nel sangue o degli elevati livelli nel siero di ECP<sup>9</sup>. Inoltre, è stata riscontrata un'associazione significativa, sebbene variabile, tra l'attivazione degli eosinofili, gravità dell'asma ed iperresponsività delle vie aeree<sup>42</sup>.

Sebbene, da quanto sopra detto, l'eosinofilia nell'espettorato sia una caratteristica tipica della patologia asmatica, l'utilizzo sempre più frequente di questa metodica ha portato al riconoscimento che l'infiammazione è più eterogenea di quanto creduto in passato, con l'identificazione di forme di asma non eosinofile<sup>45,46</sup>, riscontrabili con una prevalenza compresa tra il 25-55% tra la popolazione asmatica non trattata con cortisonici<sup>22</sup>. L'identificazione dell'asma non eosinofila è importante poiché può consentire di distinguere sottopopolazioni di soggetti asmatici in modo da interpretare meglio la risposta al trattamento antinfiammatorio. Infatti, si è riscontrato che soggetti sintomatici con bassi livelli di eosinofili nell'espettorato rispondono meno favorevolmente alla terapia corticosteroidica inalatoria<sup>46</sup>, almeno a breve termine, rispetto

a soggetti asmatici in cui risulta più alta la quota eosinofila nell'espettorato<sup>47</sup>, da ciò consegue che l'entità del miglioramento delle funzioni respiratorie in seguito a trattamento antinfiammatorio nell'asma dipende (correla con) dal livello di eosinofili nell'espettorato<sup>47</sup>. A questo proposito, inoltre, è stato dimostrato che l'eosinofilia correla con il grado di miglioramento clinico in seguito a trattamento con cortisonici inalatori, più strettamente rispetto ai livelli di eNO, o alla ECP nell'espettorato o nel sangue periferico<sup>48</sup>. Infine, vi è evidenza scientifica che l'eosinofilia nell'espettorato compare molto prima dell'insorgenza di una riacutizzazione, ciò suggerisce che una terapia asmatica finalizzata a normalizzare la conta degli eosinofili nell'espettorato potrebbe condurre ad una significativa riduzione delle stesse riacutizzazioni asmatiche, da qui l'importanza di monitorare la flogosi delle vie aeree tramite lo studio dell'espettorato per ridurre il numero di riacutizzazioni frequenti (comuni) nella patologia asmatica<sup>49 50</sup>.

**Neutrofili.** I neutrofili, considerati per lungo tempo come cellule in stadio di differenziazione terminale, incapaci di sintesi proteica e deputati solo a ruolo di effettori passivi della flogosi, mediante la fagocitosi ed il rilascio di enzimi preformati e di composti citotossici, possono rilasciare un'ampia gamma di enzimi tra cui la proteasi, specie reattive dell'ossigeno, citochine e chemochine come l'IL-1 $\beta$ , il TNF- $\alpha$ , l'IL-6 e l'IL-8<sup>42</sup>. È stato osservato un aumento della quota neutrofila nell'espettorato di soggetti con riacutizzazioni da moderate, a severe o addirittura mortali di asma<sup>49 51</sup>. Inoltre, il livello della quota neutrofila nell'espettorato di soggetti asmatici risulta essere più marcato nel corso di infezioni bronchiali, in particolar modo se batteriche, anche se ad elevati livelli di neutrofilia nell'espettorato sono associate anche le infezioni virali<sup>51</sup>. Altre cause di ele-

vati livelli neutrofili associati alla condizione asmatica possono essere osservati in caso di abitudine tabagica ed esposizione ad endotossine dovuta ad infezioni batteriche<sup>8</sup>.

Tra i principali *markers* di attivazione delle cellule infiammatorie o dei *markers* di aumentata permeabilità vascolare riscontrabili nell'espettorato di soggetti asmatici vanno menzionate la ECP, la mieloperoxidasi (MPO), attraverso i quali, rispettivamente, viene valutata la presenza di eosinofili e neutrofili, la triptasi, l'interleuchina-5 (IL-5), l'albumina, il fibrinogeno e l'alfa2-macroglobulina. Recenti approcci prevedono anche la misura dei cisteinil-leucotrieni (cys-LT), delle prostaglandine (PGD2) e del thromboxane<sup>8</sup>.

In conclusione, la valutazione dei *markers* di infiammazione bronchiale nell'espettorato indotto contribuisce ad una migliore caratterizzazione del soggetto asmatico, a parità di altre caratteristiche clinico-funzionali della malattia, pertanto per le sue potenzialità nel diagnosticare la presenza, le caratteristiche e la severità della flogosi bronchiale, l'analisi dell'espettorato indotto può costituire lo strumento futuro per il monitoraggio clinico e la gestione della patologia asmatica.

### Tosse cronica

La tosse cronica è associata con una predominanza di neutrofili nell'espettorato, ma fino al 40% dei soggetti con tosse presenta una conta di eosinofili nell'espettorato superiore al 3%<sup>52</sup>. In circa il 50% di questi soggetti non vi è alcuna evidenza funzionale di asma bronchiale in quanto affetti da bronchite eosinofila non asmatica. La valutazione dello stato infiammatorio delle vie aeree è il solo modo per identificare questi soggetti ed è perciò un passaggio fondamentale nell'algoritmo dello studio della tosse cronica<sup>52 53</sup>. Tale considerazione è stata ribadita nelle Linee Guida sulla tosse redatte

dall'*American College of Chest Physicians*, le quali hanno sottolineato l'importanza diagnostica dell'analisi dell'espettorato indotto nel confermare la diagnosi di bronchite eosinofila non asmatica<sup>54</sup>. Studi ulteriori, invece, sono richiesti a supporto dell'utilizzo dello studio dell'espettorato, in particolare, nella determinazione delle caratteristiche citologiche dell'escreato della tosse associate a reflusso gastroesofageo, rinite ed infezioni virali<sup>55</sup>. Infine, vi è evidenza scientifica che soggetti con tosse ed elevati livelli di eosinofili nell'espettorato rispondono positivamente alla terapia corticosteroidica, a cui segue una caduta della quota eosinofila nello stesso escreato<sup>52</sup>. Viceversa, soggetti senza escreato eosinofilo non rispondono al trattamento corticosteroidico<sup>56</sup>.

### **Patologie interstiziale e patologie professionali**

Ancora poco si sa riguardo alle caratteristiche cellulari dell'espettorato in altre malattie respiratorie, quali ad es. le patologie interstiziali del polmone (ILDs) o le patologie di origine professionale. Recenti studi hanno dimostrato il ruolo potenziale dell'IS nell'identificare patologie interstiziali dall'eziologia sconosciuta, quali la sarcoidosi<sup>57,58</sup> o la fibrosi polmonare idiopatica (IPF)<sup>57,59</sup>, quest'ultima caratterizzata da un'inflammazione di tipo sia neutrofilico che eosinofilo<sup>22</sup>. Infatti, ad es. è stato dimostrato che, in caso di sarcoidosi, l'analisi dell'IS ha la stessa capacità diagnostica del BAL, grazie alla sua capacità di evidenziare alte percentuali di linfociti CD4<sup>58,59</sup>, mentre la valutazione del rapporto CD4/CD8 nell'IS si è riscontrata essere superiore alla conta differenziale linfocitaria e neutrofila in soggetti con IPF<sup>60</sup>, mostrando, così, che tale metodica può rivelarsi predittiva, con alta specificità e sensibilità nella diagnosi differenziale delle stesse patologie al pari del BAL<sup>61</sup>. In

particolare, attraverso l'analisi dell'IS, è possibile evidenziare un accumulo di cellule infiammatorie, specialmente neutrofili, nello spazio alveolare di soggetti con IPF, oltre ad evidenziare che la quota di IL-8 nello stesso espettorato correla con la percentuale di neutrofili e la capacità vitale in tutti i soggetti affetti da tale patologia<sup>62</sup>. Inoltre, la conta differenziale nell'IS ed il valore medio dell'ECP, le quali sono significativamente più alti in soggetti con IPF, possono essere utilizzati per identificare un aumento di tosse riflessa negli stessi<sup>63</sup>.

Altri lavori di ricerca hanno, poi, sottolineato il ruolo della metalloproteinasi-9 quale molecola infiammatoria coinvolta nei processi di rimodellamento nella sarcoidosi<sup>64</sup>, nell'IPF<sup>65</sup> ed in patologie ad esposizione professionale<sup>66</sup>.

Infine, alcuni ricercatori hanno studiato attraverso l'analisi dell'IS, la risposta al trattamento in tali patologie. Riconstrandolo, tra gli altri risultati, una caduta nei livelli del TNF- $\alpha$  nei 6 mesi successivi al trattamento con lo steroide in accordo ai risultati ottenuti con il BAL, in soggetti con sarcoidosi. È attualmente in studio, sempre attraverso l'analisi dell'IS, il ruolo dell'IL-8 come *markers* infiammatorio nella patogenesi dell'IPF ed il suo grado di correlazione al significativo decremento, nei 12 mesi successivi, a terapia con interferone-gamma<sup>67</sup>.

Recentemente, l'utilizzo dell'analisi dell'IS si è rivelato un utile strumento anche nello studio delle patologie respiratorie di origine professionale. In particolare, l'utilizzo dell'analisi cellulare dell'IS è stata indicata nell'asma professionale (OA)<sup>68</sup>. È stato, infatti, rilevato un incremento della quota eosinofila nell'espettorato di soggetti affetti da OA comparabili con quelli riscontrabili nella comune asma bronchiale<sup>50</sup>. Il suo utilizzo nella pratica clinica ha poi permesso di identificare una condizione spesso trascura-

ta: la bronchite eosinofila professionale<sup>68</sup>. In effetti, vi è evidenza che la quota eosinofila nell'escreato aumenta durante l'esposizione sul posto di lavoro in soggetti con asma professionale. Inoltre si riscontra un incremento della quota neutrofila in soggetti esposti a sostanze inquinanti ambientali, quali ad es. isocianati o gas metallurgici<sup>69</sup>. Per concludere, lo studio dell'IS si è rivelato estremamente utile anche nel quantificare l'esposizione ambientale a particolato carbonaceo, muffe e pollini, a riconoscere l'esposizione a minerali in malattie polmonari professionali o ad identificare batteri intracellulari<sup>22</sup>.

## Conclusioni

Recentemente, nei programmi di ricerca, un certo numero di ipotesi sono state avanzate sulle varie metodiche in grado di valutare e misurare *biomarkers infiammatori*. In particolare modo, negli ultimi decenni, sono state messe a punto metodiche meno invasive, rispetto ai *gold standard* per la misurazione dello stato di flogosi bronchiale, rappresentati dal BAL e dalle biopsie bronchiali, quali quelle dell'analisi dei gas esalati, dell'esalato condensato e dell'espettorato indotto. Tra queste emerge, in particolare, l'analisi dell'espettorato indotto, metodica standardizzata e validata, che, per l'alto grado di sensibilità e non-invasività, ha assunto, nell'ultima decade, un ruolo sempre più centrale nel caratterizzare il profilo infiammatorio alla base delle più comuni patologie dell'apparato respiratorio, tra le quali: l'asma, la BPCO e la tosse cronica. A questo proposito, evidenze scientifiche supportano la sua importanza nel fornire utili indicazioni sia nella diagnostica, migliorando la comprensione della patogenesi, sia nella gestione clinica. Pertanto, è lecito pensare che sia giunto il momento per tale metodica di uscire dal campo della ricerca per entrare a pieno titolo in quello della pratica clinica.

## PUNTI CHIAVE

- La metodica è stata standardizzata e validata da numerosi studi sintetizzati in un documento della *task force* dell'*European Respiratory Society*.
- La metodica è riproducibile e sono stati prodotti i valori di normalità delle diverse linee cellulari.
- Il processo di induzione dell'espettorato è stato previsto anche per i soggetti con ostruzione bronchiale severa.
- Il marcatore più utilizzato e la percentuale degli eosinofili.
- La percentuale degli eosinofili nell'espettorato indotto ha favorito le scelte terapeutiche e la migliore gestione dell'asma bronchiale, della BPCO con presenza di eosinofili e della tosse cronica.

## Bibliografia

- 1 Gollasch H. *Zur Kemitnis des astmatischen sputums*. Fortschritte der Medizin (Berlin) 1889;7:361-5.
- 2 Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, et al. *Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma*. Thorax 1992;47:25-9.
- 3 Djukanovic P, Roche WR, Wilson JW, et al. *Mucosal inflammation in asthma: state of the art*. Am Rev Respir Dis 1990;142:434-57.
- 4 Busse W, Elias J, Sheppard D, et al. *NHLBI workshop summary. Airway remodelling and repair*. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:1035-42.
- 5 Boulet L-P, Becker A, Dérubé D, et al.; on behalf of the Canadian Asthma Consensus Group. *Canadian asthma consensus report, 1999*. CMAJ 1999;161(Suppl. 11):S1-S12.
- 6 Haley K, Drazen J. *Inflammation and airway function in asthma. What you see is not necessarily what you get*. Am J Respir Crit Care Med 1998;157:1-3.
- 7 Fahy JV, Liu J, Wong H, et al. *Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and healthy individuals*. Am Rev Respir Dis 1993;146:1126-31.

- 8 Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, et al. *Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid phase measurements.* Am J Respir Crit Care Med 1996;154:308-17.
- 9 Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, et al. *Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood.* J Allergy Clin Immunol 1997;99:539-44.
- 10 Al-Ali MK, Howarth PH. *Nitric oxide and the respiratory system in health and disease.* Respir Med 1998;92:701-15.
- 11 Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, et al. *Prednisone dependent asthma: inflammatory indices in induced sputum.* Eur Respir J 1999;13:15-21.
- 12 Vignola AM, Bousquet J, Chanez O, et al. *Assessment of airway inflammation in asthma.* Am J Respir Crit Care Med 1998;157:S184-S187.
- 13 Popov T, Pizzichini MMM, Pizzichini E, et al. *Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis.* Eur Respir J 1995;8:559-65.
- 14 Tongoussova O, Migliori GB, Faschino-Barbaro MP, et al. *Changes in sputum composition during 15 min of sputum induction in healthy subjects and patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* Respir Med 2007;101:1543-8.
- 15 Iredale Mj, Wanklin SAR, Phillips IP, et al. *Non-Invasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline.* Clin Exp Allergy 1994;24:940-5.
- 16 Wong HH, Fahy JV. *Safety of one method of sputum induction in asthmatic subjects.* Am J Respir Crit Care Med 1997;156:299-303.
- 17 Spanevello A, Beghè B, Bianchi A, et al. *Comparison of two methods of processing induced sputum: selected v sentire sputum.* Am J Respir Crit Care Med 1988;157:665-8.
- 18 Spanevello A, Migliori GB, Sharara AM, et al. *Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility.* Clin Exp Allergy 1997;27:1138-44.
- 19 In't Veen JCCM, DE Gouw HWFM, Smits HH, et al. *Repeatibility of cellular and soluble markers of inflammation in induced sputum from patients with asthma.* Eur Respir J 1996;9:2441-7.
- 20 Belda J, Leigh R, Parameswaran K, et al. *Induced sputum cell counts in healthy adults.* Am J Respir Crit Care Med 2000;161:475-8.
- 21 Spanevello A, Confalonieri AM, et al.; on behalf of AIPO Study Group Induced Sputum Cellularity. *Reference values and distribution in normal volunteers.* Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1172-4.
- 22 Brightling CE. *Clinical applications of induced sputum.* Chest 2006;129:1344-8.
- 23 National Institutes of Health. *Global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD).* Bethesda, MD: NIH 2001 (Publication n. 2701).
- 24 Turato G, Zuin R, Beraldo S, et al. *Aspetti istopatologici della broncopneumopatia cronica ostruttiva.* Ann Ist Super Sanità 2003;39(4):507-517.
- 25 Stanescu D, Sanna A, Veriter C, et al. *Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV<sub>1</sub> in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils.* Thorax 1996;51:267-71.
- 26 Keatings VM, Barnes PJ. *Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects.* Am J Respir Crit Care Med 1997;155:449-53.
- 27 Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, et al. *Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease.* J Allergy Clin Immunol 1993;92:537-48.
- 28 Peleman RA, Rutila PH, Kips JC, et al. *The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J 1999;13:839-43.
- 29 Saetta M, Di Stefano A, Turato G, et al. *CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med 1998;157:822-6.
- 30 Brightling CE, Monteiro W, Ward R, et al. *Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial.* Lancet 2000;356:1480-5.
- 31 Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson P, et al. *Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J 1996;9:2441-7.

- ive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1511-7.
- 32 Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, et al. *Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations*. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1646-52.
- 33 Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, et al. *Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis*. *Clin Exp Allergy* 1996;26:766-74.
- 34 Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, et al. *Sputum eosinophilia and the short term response to inhaled mometasone in chronic obstructive pulmonary disease*. *Thorax* 2005;60:3-198.
- 35 Hill AT, Bayley D, Stockley RA. *The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:893-8.
- 36 Keatings VM, Collins PD, Scott DM, et al. *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;153:530-4.
- 37 Beeh KM, Beier J, Kornmann O, et al. *Long-term repeatability of induced sputum cells and inflammatory markers in stable, moderately severe COPD*. *Chest* 2003;123:778-83.
- 38 Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, et al. *Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8*. *Chest* 1997;112:505-10.
- 39 Hoshi H, Ohno I, Honma M, et al. *IL-5, IL-8 and GM-CSF immunostaining of sputum cells in bronchial asthma and chronic bronchitis*. *Clin Exp Allergy* 1995;25:720-8.
- 40 Chalmers GW, Macleod KJ, Sriram S, et al. *Sputum endothelin-1 is increased in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease*. *Eur Respir J* 1999;13:1288-92.
- 41 Tomai M, Ichinose M, Miura M, et al. *Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:613-7.
- 42 National Institutes of Health. *Global Initiative for Asthma (GINA)*. Publ. N° 02-3659. Bethesda, MD: NHLBI 2004.
- 43 Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al. *Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-45.
- 44 Kirbi, Hargreave FE, Gleich GJ, et al. *Bronchoalveolar cell profiles of asthmatic and nonasthmatic subjects*. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:379-83.
- 45 Green RH, Brightling CE, Woltmann G, et al. *Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of sub group with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids*. *Thorax* 2002;57:875-9.
- 46 Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, et al. *Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma*. *Lancet* 1999;353:2213-4.
- 47 Bacci E, Cianchetti S, Batoli M, et al. *Low sputum eosinophils predict the lack of response to beclomethasone in symptomatic asthmatic patients*. *Chest* 2006;129:565-72.
- 48 Meijer RJ, Postma DS, Kauffman HF, et al. *Accuracy of eosinophils and eosinophil cationic protein to predict steroid improvement in asthma*. *Clin Exper Allergy* 2002;32:1096-103.
- 49 Green PG, Brightling CE, McKenna S, et al. *Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial*. *Lancet* 2002;360:1715-21.
- 50 Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. *Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:64-72.
- 51 Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. *Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8*. *Chest*. 2001;119:1329-36.
- 52 Brightling CE, Ward R, Goh KL, et al. *Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough*. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:406-10.
- 53 Brightling CE. *Chronic cough due to nonasthmatic eosinophilic bronchitis: ACCP evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest* 2006;129(Suppl. 1):116S-121S.
- 54 Melvin R, Pratter MR, Brightling CE, et al. *An empiric integrative approach to the management of cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest* 2006;129(Suppl. 1):222S-231S.
- 55 Irwin RS. *Chronic cough due to gastroesophageal reflux disease: ACCP evidence-*



- based clinical practice guidelines.* Chest 2006;129(Suppl. 1):80S-89S.
- <sup>56</sup> Pizzichini MM, Pizzichini E, Parameswaran K, et al. *Nonasthmatic chronic cough: no effect of treatment with an inhaled corticosteroid in patients without sputum eosinophilia.* Can Respir J 1999;6:323-30.
- <sup>57</sup> Fireman E, Lerman Y. *Induced sputum in interstitial lung diseases.* Curr Op Pulm Med 2006;12:318-22.
- <sup>58</sup> D'ippolito R, Foresi A, Chetta A, et al. *Induced Sputum in patients with newly diagnosed sarcoidosis.* Chest 1999;115:1611-5.
- <sup>59</sup> Fireman E, Topilsky I, Greif J, et al. *Evaluation of interstitial lung diseases by induced sputum compared to bronchoalveolar lavage.* Respir Med 1999;93:827-34.
- <sup>60</sup> Welker L, Jörres RA, Costabel U, et al. *Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung disease.* Eur Respir J 2004;24:1000-6.
- <sup>61</sup> Antoniou KM, Alexandrakis M, Tzanakis N, et al. *Induced sputum versus bronchoalveolar lavage fluid in the evaluation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis.* Respiration 2005;72:32-8.
- <sup>62</sup> Beek KM, Beier J, Kornmann O, et al. *Neutrophilic inflammation in induced sputum of patients with idiopathic pulmonary fibrosis.* Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2003;20:138-43.
- <sup>63</sup> Birring SS, Parker D, McKenna S, et al. *Sputum eosinophilia in idiopathic pulmonary fibrosis.* Inflamm Res 2005;54:51-6.
- <sup>64</sup> Fireman E, Kraiem Z, Sade O, et al. *Induced sputum-retrieved matrix metallo-proteinase 9 and tissue metalloproteinase inhibitor 1 in granulomatous diseases.* Clin Exp Immunol 2002;130:331-7.
- <sup>65</sup> Beek KM, Beier J, Kornmann O, et al. *Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects.* Respir Med 2003;97:634-9.
- <sup>66</sup> *Unexpected smoking-linked high MM-9 in induced sputum of hazardous dust-exposed workers.* Mediators Inflamm 2006 (in press).
- <sup>67</sup> Antoniou KM, Tzortzaki EG, Alexandrakis MG, et al. *Investigation of IL-18 and IL-12 in induced sputum of patients with IPF before and after treatment with interferon gamma-1b.* Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2005;22:204-9.
- <sup>68</sup> Lemiere C. *Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures.* Curr Op Allergy Clin Imm 2007;7:133-7.
- <sup>69</sup> Cicutto LC, Downey GP. *Biological markers in diagnosing, monitoring and treating asthma: a focus on noninvasive measurements.* AACN 2004;15:97-110.

## OSSIDO NITRICO ESALATO

**Mario Malerba**

*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Brescia, 1<sup>a</sup> Medicina, Spedali Civili di Brescia*

L'ossido nitrico (NO) è il bio-marcatore presente nell'aria esalata più diffusamente studiato. Per la prima volta, nel 1991 venne rilevata la presenza di NO nell'aria espirata (eNO) di alcune specie animali e dell'uomo<sup>1</sup>. Successivamente, modificazioni nella concentrazione di eNO sono state documentate in numerose patologie respiratorie<sup>2</sup> in particolare nell'asma bronchiale<sup>3,4</sup>. Da allora la metodica di misurazione dell'eNO e l'interpretazione dei dati ottenuti è progredita sensibilmente e, nel 2004, la *Food and Drug Administration* ha approvato la misura di NO nell'espriato come test da impiegare nel monitoraggio clinico del paziente asmatico. La misurazione di eNO è riconosciuta come metodica riproducibile<sup>5</sup> e dal 2005 sono disponibili le Linee Guida congiunte dell'*European Respiratory Society* (ERS) e dell'*American Thoracic Society* (ATS) concernenti le procedure da considerare per la sua esecuzione<sup>6</sup>.

### Origine dell'ossido nitrico nell'aria esalata

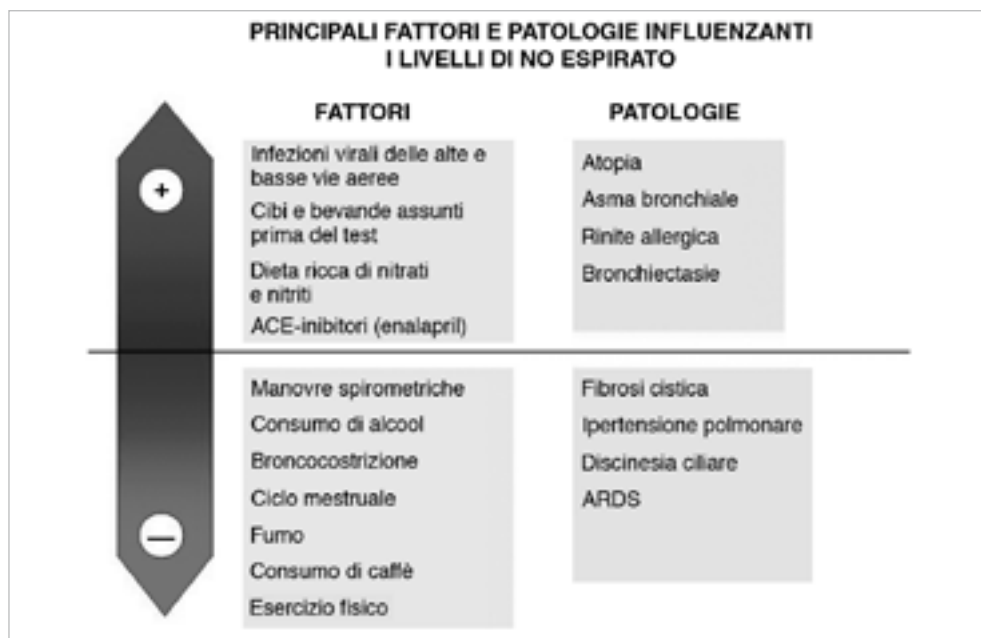
La sintesi di NO è mediata da enzimi denominati NO sintasi (NOS), presenti in 2 isoforme: inducibile (iNOS) e costitutiva (cNOS), quest'ultima individuabile nelle cellule endoteliali (eNOS) ed in quelle del

tessuto neurale. Tutte le forme di NOS sono presenti nelle vie aeree<sup>7</sup>, tuttavia le concentrazioni di eNO riflettono essenzialmente la componente prodotta dalla isoforma iNOS, particolarmente attiva nelle cellule epiteliali delle vie aeree e la cui attività è incrementata in corso di processi infiammatori delle vie respiratorie.

L'eNO origina contemporaneamente dagli alveoli e dalle vie aeree, attualmente è stato definito un modello a 2 compartimenti, in cui il flusso di NO dalle cellule di produzione, diffonde nel lume delle vie aeree venendo poi emesso con l'aria espirata<sup>8</sup>. La possibilità attuale di misurare la concentrazione di NO a livello dei diversi compartimenti appare molto interessante ma non ha ancora applicazione clinica definitiva<sup>9</sup>.

### La misurazione di ossido nitrico nell'aria esalata

La misurazione della concentrazione di eNO avviene attraverso un apparecchio a chemiluminescenza che rileva la luce prodotta dall'eNO dopo reazione con l'ozono generato dall'apparecchio. Si sviluppa un composto, il biossido d'azoto (NO<sub>2</sub>) ed una radiazione luminosa, quindi viene calcolata indirettamente la concentrazione di eNO in base all'intensità del segnale luminoso emesso, con



**Figura 1.** Principali fattori e patologie influenzanti i livelli di NO espirato.

una sensibilità intorno a 1 parte per miliardo (1 ppb)<sup>10</sup>. NO è costantemente prodotto nelle vie aeree e la sua concentrazione è strettamente dipendente dal flusso di espirazione (nelle recenti linee guida il flusso di 50 mL/s è considerato per la misurazione di NO)<sup>6</sup>.

#### Misurazioni on line

L'eNO viene determinato direttamente durante una singola espirazione forzata, partendo da capacità vitale totale inspirando aria a bassa concentrazione di NO (< 0,05 ppb). Il soggetto inspira profondamente fino a capacità polmonare totale e successivamente espira (per almeno 6 secondi per consentire una fase di stabilità di almeno 3 sec) attraverso un bocchaglio connesso all'analizzatore. Durante l'espirazione, a flusso costante di 50 mL/s grazie ad una resistenza applicata, viene creata una pressione positiva nella cavità orale (di 10-15 mmHg) che assicura la chiusura del palato molle escludendo una possibile contaminazione con le cavità nasa-

li che fisiologicamente ospitano alte concentrazioni di NO<sup>11</sup>.

#### Misurazioni off line

Meno utilizzata questa misurazione prevede l'analisi dell'NO sull'aria espirata raccolta in apposite sacche impermeabili all'aria ambientale<sup>6</sup>.

- *Fattori influenzanti la misurazione di eNO* (Fig. 1)

I valori di eNO sono indipendenti da sesso, età (tranne che nei bambini) e funzionalità polmonare<sup>12,13</sup>. Non sono state osservate significative variabilità giornaliere<sup>14</sup> e la misurazione di eNO è attualmente altamente riproducibile<sup>5,6</sup>. Tuttavia svariati fattori sono in grado di alterare i valori di eNO rilevati e pertanto è necessario tenerne conto. L'esercizio fisico<sup>15,16</sup>, l'esecuzione di prove di funzionalità respiratoria<sup>17</sup> e lo sputo indotto effettuati prima della misurazione di NO tendono a ridurre i valori di eNO<sup>18</sup>. Il fumo e l'assunzione di alcool riducono i va-

**Tabella I. Valori normali di eNO.**

| <b>Autori, anno pubblicazione</b>    | <b>N. Soggetti</b> | <b>eNO (ppb)</b> |
|--------------------------------------|--------------------|------------------|
| Kharitonov et al., 2003 <sup>5</sup> | 10                 | 17,8 ± 6,8       |
| Malerba et al., 2001 <sup>100</sup>  | 19                 | 9,3 ± 2,8        |
| Olin et al., 2001 <sup>25</sup>      | 202 non fumatori   | 15,5 ± 0,9       |
| Olivieri-Malerba, 2006 <sup>28</sup> | 204                | 10,8 ± 4,7       |
| Olin et al., 2006 <sup>101</sup>     | 2200               | 16,0             |
| Olin et al., 2007 <sup>102</sup>     | 3376 non fumatori  | 16,6 (5,7-47,1)  |

lori di eNO<sup>19-22</sup>, le infezioni respiratorie<sup>23 24</sup> e l'assunzione di alimenti contenenti nitrati aumentano i valori di eNO<sup>25</sup>. Infine il potenziale effetto di farmaci sulla misurazione di eNO non può essere escluso pertanto è sempre necessario riportare eventuali terapie in atto.

### **L'interpretazione della misurazione di eNO**

#### *Valori di normalità (Tab. I)*

Negli individui sani i valori di eNO si situano generalmente tra 10 e 25 ppb (5-15 nei bambini), inoltre il 97% degli individui sani avrebbe un valore di eNO inferiore a 37 ppb (25 ppb nei bambini). I valori di eNO sarebbero dipendenti dall'età nei bambini, innalzandosi nell'adolescenza per poi non modificarsi in misura significativa durante il resto della vita<sup>26 27</sup>. Va precisato che non esistono a tutt'oggi valori di normalità specifici per soggetti al di sopra dei 65 anni. In sintesi, dai risultati degli studi più recenti, emerge che i valori di riferimento di eNO in soggetti adulti sani, non atopici e non fumatori risultano compresi tra 10 e 20 ppb<sup>28 29</sup>.

### **L'ossido nitrico esalato nelle patologie respiratorie (Tab. II)**

#### **Asma e malattie allergiche**

##### *Atopia e infiammazione delle vie aeree*

I livelli di eNO sono elevati nei soggetti allergici<sup>30-33</sup>, in particolare risultano aumen-

tati dopo esposizione ad allergeni in soggetti sensibilizzati<sup>34-36</sup>. Recentemente sono stati pubblicati studi che dimostrano la possibilità di monitorare l'infiammazione delle vie aeree attraverso la misurazione dell'eNO. Nell'asma i valori di eNO riflettono quelli degli eosinofili nello sputo indotto<sup>37</sup> nel BAL<sup>38</sup> e nelle biopsie bronchiali<sup>39 40</sup>. Inoltre studi epidemiologici, in particolare su adolescenti, hanno evidenziato correlazione tra valori di eNO ed eosinofilia periferica<sup>41 42</sup>. I livelli di eNO correlano inoltre con l'iperreattività bronchiale<sup>41 42</sup> soprattutto nei soggetti con asma non controllata farmacologicamente<sup>43</sup>. È stato osservato che i valori di eNO sono correlati all'eosinofilia delle vie aeree nei pazienti atopici e risultano elevati nei pazienti con rinite e iperreattività bronchiale senza sintomi e sono particolarmente elevati nei soggetti atopici con asma in fase di attività. Queste correlazioni sono comunque presenti anche nei soggetti non atopici, ma rivestono minore importanza.

##### *Asma bronchiale*

Elevati valori di eNO sono stati chiaramente documentati nei soggetti asmatici<sup>44 45</sup>, pertanto sono stati proposti molteplici utilizzi clinici della misurazione di eNO in questi pazienti.

Livelli elevati di eNO non sono specifici per l'asma bronchiale, tuttavia la misurazione di eNO può rilevarsi un utile strumento per individuare l'asma differenziandola da altre cause di tosse cronica. Recentemente sono

**Tabella II.** Guida all'interpretazione dei valori di eNO (flusso di 50 ml/sec).

| Bassi valori<br>< 5 ppb  | Valori normali<br>5-20 ppb   | Valori aumentati<br>20-35 ppb        | Valori molto aumentati<br>> 35 ppb   |
|--|--|--------------------------------------|--|
| Assenza di probabilità per diagnosi di asma bronchiale   | Bassa probabilità di diagnosi di asma bronchiale o asma bronchiale in trattamento efficace | Buona probabilità di asma bronchiale | Elevata probabilità di asma bronchiale   |
| Si considerino diagnosi alternative:<br><br>- Tosse secca stizzosa da RGE- post nasal drip<br>- Tabagismo<br>- Fibrosi Cistica<br>- Discinesia ciliare primitiva | Si considerino diagnosi alternative  |                                      | Paziente non trattato: buona probabilità di risposta a steroidi<br><br>Paziente in trattamento:<br>- No compliance<br>- Dose troppo bassa di steroidi<br>- Steroide-resistenza<br>- Esposizione ad allergeni |

stati proposti dei livelli di cut-off per individuare soggetti affetti da asma bronchiale. Due lavori recenti <sup>46,47</sup> hanno indicato che valori di eNO > 12 ppb hanno una specificità del 80% e una sensibilità del 81% per individuare soggetti asmatici in una popolazione di soggetti con tosse cronica, mentre per il valore di eNO > 16 ppb la specificità è circa il 90%. Eosinofilia nello sputo indotto e un valore di eNO superiore a 20 ppb si sono dimostrati test diagnostici per identificare i soggetti asmatici più accurati dei test spirometrici convenzionali <sup>48</sup>.

#### Relazione con la terapia anti-infiammatoria

La misurazione dei valori di eNO ( espressione dello stato flogistico delle vie aeree) è stata utilizzata per un accurato monitoraggio del trattamento anti-infiammatorio nel paziente asmatico.

#### - Corticosteroidi

I livelli di eNO si comportano come *bio-marker* precoce estremamente sensibile del trattamento corticosteroideo dell'asma, i livelli di eNO risultano significativamente ridotti già 6 ore dopo la prima dose per

via inalatoria <sup>49</sup> mentre l'effetto massimo viene raggiunto dopo 2-4 settimane di trattamento <sup>50-52</sup>. Questo risultato è dovuto all'inibizione dell'attività dell'enzima iNOS, come pure dall'inibizione del reclutamento di cellule infiammatorie come gli eosinofili che contengono iNOS o di interleuchine che inducono iNOS (*tumor necrosis factor  $\alpha$*  – TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ). Inoltre, l'effetto dei corticosteroidi sui valori di eNO risulta essere dose dipendente <sup>53</sup>. La sospensione o la riduzione del dosaggio steroideo corrispondono ad un incremento precoce (rispetto a eosinofili e parametri clinici-funzionali) dei valori di eNO <sup>53,54</sup>.

#### - Antileucotrienici

Diversi studi indicano che anche il trattamento con farmaci antileucotrienici è in grado di ridurre nei soggetti asmatici i livelli di eNO <sup>55,56</sup>. Inoltre si è documentato che il montelukast è in grado di ridurre i valori di eNO fin dal primo giorno di utilizzo, ottenendo un effetto massimo dopo il 7° giorno. È stato osservato che la sospensione del trattamento non è in grado di provocare un innalzamento dei valori di eNO prima di

una settimana<sup>57</sup>. L'aggiunta di montelukast alla terapia steroidea permette un'ulteriore riduzione dei valori di eNO<sup>58</sup>, ma già dopo 2 settimane di sospensione della terapia i livelli di eNO si riportano a livelli pre-trattamento<sup>58</sup>.

*Utilità clinica di eNO nella gestione dell'asma bronchiale*

- *Indicatore di risposta agli steroidi*

La misurazione di eNO costituisce un importante strumento diagnostico non invasivo e rapido per valutare il grado di responsività agli steroidi nei pazienti asmatici. In pazienti con sintomi respiratori aspecifici elevati livelli di NO espirato > di 47 ppb prefigurano una successiva risposta positiva al trattamento con steroidi più efficacemente della spirometria o del monitoraggio del PEF<sup>59</sup>.

- *Monitoraggio della compliance*

La riduzione degli elevati livelli di eNO in corso di terapia corticosteroidica sono indicatori di una corretta compliance al trattamento<sup>60</sup>, mentre la mancata riduzione indicherebbe in prima istanza una condizione di non corretta compliance (tecnica o posologica). Pertanto, solo dopo che questa sia stata esclusa, si potrebbe ipotizzare una condizione di asma refrattaria alla terapia steroidea.

- *Indicatore di perdita del controllo dell'asma bronchiale*

Il controllo seriato dell'eNO nel follow up del paziente asmatico può costituire un indice affidabile per predire le riacutizzazioni di asma, in quanto è stato documentato, che un suo incremento spesso precede un peggioramento dell'iperreattività bronchiale, dell'eosinofilia nello sputo indotto e del risultato delle prove di funzionalità respiratoria<sup>54</sup>. In particolare nel paziente asmatico asintomatico, la sospensione dei corticosteroidi inalatori (per un massimo di 6 settimane) con un'aumento del livello di eNO di 15 ppb o del 60% tra una visita e la successiva, rappresenta un fattore indicativo (oltre 80% di probabilità) di un imminente peggioramento dell'asma (valore predittivo positivo di circa

88%). Anche metodiche come l'espettorato indotto o il test di broncostimolazione hanno un buon potere predittivo, tuttavia l'eNO ha il vantaggio di essere rapido, semplice e non invasivo<sup>54 61</sup>.

- *Ottimizzazione del trattamento*

La misurazione dell'eNO esalato è uno strumento-guida utile per ridurre la dose di mantenimento di corticosteroidi inalatori senza compromettere il controllo farmacologico dell'asma. In un gruppo di asmatici seguito con la misura dell'eNO, la dose media finale di fluticasone era circa la metà (370 mcg) rispetto alla dose media finale (641 mcg) del gruppo di asmatici seguiti sulla base delle linee guida tradizionali per la gestione clinica dell'asma. Inoltre, la modulazione del trattamento corticosteroidico basato sulla misurazione dell'eNO migliora la gestione dell'asma in termini di iperreattività bronchiale e di minor flogosi, con minori effetti collaterali<sup>59 62 63</sup>.

### **Broncopneumopatia cronica ostruttiva**

I livelli di eNO nei pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) in fase di stabilità clinica, risultano inferiori ai valori riscontrati nei soggetti asmatici e non si discostano significativamente dai valori dei soggetti sani di controllo<sup>19 20 64 65</sup>. È stato ipotizzato che i bassi valori di eNO siano legati all'effetto del fumo di sigaretta che provocherebbe una riduzione dell'attività delle eNOS. Pertanto, anche valori relativamente bassi di eNO possono riflettere, nei pazienti con BPCO la presenza di infiammazione delle vie aeree. Durante le fasi di esacerbazione della BPCO si osserva un incremento significativo dei valori di eNO, probabilmente correlato all'aumento dell'infiammazione neutrofila nelle vie aeree<sup>66</sup>. È interessante sottolineare che vi è un sottogruppo di pazienti con BPCO che presenta più elevati valori di eNO in corso di esacerbazioni, poiché ciò è associato ad un maggior contenuto di eosinofili nell'espettorato

torato indotto e ad una miglior risposta al trattamento con steroidi<sup>67</sup>.

### **Fibrosi cistica**

I pazienti affetti da fibrosi cistica nonostante una elevata quota di infiammazione neutrofila nelle vie aeree presentano valori di eNO significativamente più bassi di quelli osservati in soggetti normali<sup>68</sup>. Numerose ipotesi sono state avanzate per spiegare questi bassi valori di eNO, in particolare la secrezione di muco impedirebbe meccanicamente al NO di diffondere nel lume bronchiale e quindi di essere espirato<sup>69</sup>. Un'altra ipotesi avanzata indicherebbe che le sostanze che servono a generare NO nelle vie aeree sarebbero utilizzate da *Pseudomonas aeruginosa* per vivere in condizioni di anaerobiosi<sup>70</sup>. Una terza ipotesi consisterebbe in una carenza genetica di substrati<sup>71 72</sup> e/o di NOS in grado di produrre NO<sup>73</sup>.

### **Bronchiectasie**

Nei pazienti portatori di bronchiectasie è riscontrabile un elevato valore di eNO correlato alla gravità della patologia in atto<sup>74</sup>. Come nell'asma bronchiale il trattamento con corticosteroidi è in grado di diminuire i valori di eNO, suggerendo che nelle bronchiectasie l'eNO possa riflettere il processo infiammatorio delle vie aeree e che pertanto possa essere utilizzabile nel monitoraggio del trattamento anti-infiammatorio<sup>75</sup>. Per contro, altri Autori hanno riscontrato nei pazienti bronchiectasici valori di eNO ridotti suggerendo che l'eNO possa essere trattenuto dalle secrezioni viscoso o consumato da reazioni ossidative<sup>76</sup>.

### **Discinesia ciliare primitiva**

La discinesia ciliare primitiva, compresa la sindrome di Kartagener, è una patologia genetica caratterizzata da una alterazione della mobilità delle ciglia delle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio. A motivo di tali modificazioni strutturali dell'albero

bronchiale, in questa condizione patologica i valori di eNO sono più bassi di quelli riscontrati nei soggetti sani di controllo<sup>77</sup>. La misurazione di eNO è stata proposta come test di screening per diagnosticare la discinesia ciliare primitiva nei pazienti con ricorrenti infezioni respiratorie e infertilità dovuta a immobilità degli spermatozoi<sup>78</sup>. La causa di così ridotti valori di eNO (tanto a livello delle vie aeree quanto a livello nasale) non è ancora stata ancora chiarita ma probabilmente è conseguenza delle alterazioni nella espressione genetica di NOS2 così come avviene nella fibrosi cistica.

### **Ipertensione polmonare**

La patogenesi dell'ipertensione polmonare non è a tutt'oggi completamente chiarita, probabilmente la vasocostrizione rappresenta uno dei fattori più importanti e sicuramente i livelli locali di NO svolgono un ruolo importante nel mantenimento delle resistenze polmonari. Taluni studi hanno accertato che l'ipertensione polmonare si associa a bassi valori di eNO<sup>79 80</sup>. Inoltre, è stata osservata una correlazione inversa tra i valori di pressione arteriosa sistolica polmonare e i livelli di eNO<sup>81</sup> e tra i valori di tensione parziale arteriosa di O<sub>2</sub> ed eNO<sup>80</sup>.

### **Interstiziopatie polmonari**

È necessario distinguere tra le forme di interstiziopatia complicate da ipertensione polmonare (nelle quali si evidenzia una riduzione dei valori di eNO) e le fasi iniziali delle interstiziopatie nelle quali prevalgono gli effetti dello stato flogistico dell'interstizio<sup>82</sup>.

*Fibrosi polmonare.* Vi è un aumentato reclutamento interstiziale di macrofagi, neutrofilii e cellule epiteliali nei soggetti affetti da fibrosi polmonare primitiva ed in tutte queste cellule la espressione di NOS2 è elevata, documentando elevati valori di eNO in pazienti con fibrosi polmonare durante le fasi iniziali ed intermedie<sup>83 84</sup>.

**Sclerosi sistemica.** Sono stati osservati bassi valori di eNO nei soggetti con ipertensione polmonare associata. Nei soggetti con interstiziopatia senza ipertensione polmonare alcuni autori hanno riportato valori di eNO più elevati rispetto a controlli sani ed ai pazienti con ipertensione polmonare associata<sup>82-85-87</sup>. Tuttavia è verosimile che elevati valori di eNO si vengano osservati durante le fasi iniziali della patologia, quando l'infiammazione delle vie aeree prevale sugli aspetti fibrotici della patologia<sup>82</sup>.

**Sarcoidosi.** L'infiammazione polmonare è in grado di provocare una induzione di NOS2 a livello delle vie aeree e come conseguenza vi sarebbero elevati valori di eNO nei pazienti con malattia in fase attiva non trattati con corticosteroidi<sup>88</sup>.

### **Malattie occupazionali**

Fornendo informazioni sulla infiammazione delle vie aeree la misura dell'eNO è stata proposta come strumento per la diagnosi e il monitoraggio dell'asma occupazionale<sup>89</sup>. In particolare, si è osservato che nei soggetti allergici, i livelli di eNO sono un marker sensibile della esposizione ad antigeni occupazionali specifici<sup>89</sup> e slatentizzerebbero aumenti dell'infiammazione bronchiale prima che modificazioni cliniche o funzionali siano evidenti<sup>90</sup>. Attualmente, la misura di eNO è una metodica utilizzata per integrare gli esiti di altri test respiratori (PFR o broncostimolazione specifica) in particolare in caso di risultati diagnostici border-line o poco conclusivi.

### **Infezioni respiratorie**

L'NO svolge un ruolo di protezione nel apparato respiratorio nei confronti di infezioni batteriche, fungine e virali e la riduzione della produzione endogena di NO può causare l'insorgenza di infezioni respiratorie recidivanti come menzionato in caso di fibrosi cistica e di discinesia ciliare. Durante le infezioni virali respiratorie si è potuto

documentare un'umentata concentrazione nell'espriato di eNO sia negli adulti che nei bambini<sup>23-91</sup>.

In pazienti affetti da tubercolosi in fase attiva è stato osservato un aumento dei livelli di eNO<sup>92</sup>, mentre l'esposizione del *M. Tuberculosis* a dosi < 100ppb di NO in vitro per meno di 24 ore avrebbe un effetto battericida<sup>93</sup>. Elevate concentrazioni di eNO sono state osservate anche in pazienti con polmonite e infezioni delle basse vie respiratorie<sup>94-95</sup>.

### **Neoplasie polmonari**

I livelli di eNO in pazienti affetti da neoplasie polmonari sono più elevati dei livelli riscontrati in soggetti sani di controllo<sup>96</sup>. Questo dato non risulta essere specifico per alcuni tipi di tumore ma è da attribuirsi verosimilmente a meccanismi infiammatori e immunologici aspecifici associati alla neoplasia.

### **Trapianto di polmone**

Il monitoraggio dei livelli di eNO può essere utile nel follow up dei pazienti dopo trapianto polmonare, infatti l'incidenza di bronchiolite obliterante (che costituisce la causa più comune di rigetto del trapianto) si manifesta con intensa reazione infiammatoria delle vie aeree e conseguente incremento di eNO<sup>97</sup>.

### **Sindrome da distress respiratorio dell'adulto**

La sindrome da distress respiratorio dell'adulto (ARDS) è caratterizzata da intensa infiammazione neutrofilica delle vie aeree, tuttavia sono stati documentati ridotti livelli di eNO in pazienti affetti da ARDS probabilmente per l'elevato consumo di NO da parte di anioni superossidi<sup>98</sup>. È stato ipotizzato un ruolo della misurazione di eNO per il monitoraggio di pazienti dopo by-pass cardiopolmonare, infatti l'associazione di una riduzione dei valori di eNO, con l'aumento della pressione



## PUNTI CHIAVE

- La misurazione di eNO è una tecnica sensibile, riproducibile e standardizzata.
- La misurazione di eNO è semplice e non invasiva.
- eNO è un *marker* sensibile dell'infiammazione bronchiale che si modifica rapidamente in relazione alla terapia steroidea e durante le riacutizzazioni di asma bronchiale.
- Le applicazioni cliniche dell'eNO nell'asma bronchiale includono il monitoraggio della compliance e della risposta al trattamento, della attività della patologia e la predittività delle riacutizzazioni.
- La misurazione di eNO è strumento utile per integrare altre test nella diagnosi di asma bronchiale.
- Utilizzando i valori di eNO è possibile ridurre i dosaggi di steroidi senza compromettere il controllo dell'asma bronchiale.
- I valori di eNO correlano con i marcatori di controllo della patologia nell'asma bronchiale.

polmonare ed una riduzione della compliance polmonare sono caratteristiche di iniziale danno polmonare in questi pazienti<sup>99</sup>.

## Bibliografia

- 1 Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, et al. *Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:852-7.
- 2 Kharitonov SA, Barnes PJ. *Clinical aspects of exhaled nitric oxide*. *Eur Respir J* 2000;16:781-92.
- 3 Silkoff PE, Carlson M, Bourke T, et al. *The Aerocrine exhaled nitric oxide monitoring system NIOX is cleared by the US Food and Drug Administration for monitoring therapy in asthma*. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1241-56.
- 4 Gustafsson LE. *Exhaled nitric oxide as a marker in asthma*. *Eur Respir J Suppl* 1998;26:49S-52S.
- 5 Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, et al. *Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children*. *Eur Respir J* 2003;21:433-8.
- 6 *ATS/ERS Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide, 2005*. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-30.
- 7 Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, et al. *Nitric oxide in health and disease of the respiratory system*. *Physiol Rev* 2004;84:731-65.
- 8 George SC, Hogman M, Permutt S, et al. *Modeling pulmonary nitric oxide exchange*. *J Appl Physiol* 2004;96:831-9.
- 9 Smith AD, Taylor DR. *Is exhaled nitric oxide measurement a useful clinical test in asthma?* *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:49-56.
- 10 Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, et al. *Nitric oxide in exhaled air*. *Eur Respir J* 1996;9:2671-80.
- 11 Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, et al. *High nitric oxide production in human paranasal sinuses*. *NatMed* 1995;1:370-3.
- 12 Baraldi E, Azzolin NM, Cracco A, et al. *Reference values of exhaled nitric oxide for healthy children 6-15 years old*. *Pediatr Pulmonol* 1999;27:54-8.
- 13 Ekroos H, Tuominen J, Sovijarvi AR. *Exhaled nitric oxide and its long-term variation in healthy non-smoking subjects*. *Clin Physiol* 2000;20:434-9.
- 14 ten Hasken NHT, van der Vaart H, van der Mark TW, et al. *Exhaled nitric oxide is higher both at day and night in subjects with nocturnal asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:902-7.
- 15 Deykin A, Massaro AF, Coulston E, et al. *Exhaled NO following repeated spirometry or repeated plethysmography in healthy individuals*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1237-40.
- 16 Silkoff PE, Wakita S, Chatkin J, et al. *Exhaled nitric oxide after beta2-agonist inhalation and spirometry in asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:940-4.

- 17 Phillips CR, Giraud GD, Holden WE. *Exhaled nitric oxide during exercise: site of release and modulation by ventilation and blood flow.* J Appl Physiol 1996;80:1865-71.
- 18 Piacentini GL, Bodini A, Costella S, et al. *Exhaled nitric oxide is reduced after sputum induction in asthmatic children.* Pediatr Pulmonol 2000;29:430-3.
- 19 Kharitonov SA, Robbins RA, Yates DH, et al. *Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide.* Am J Respir Crit Care Med 1995;152:609-12.
- 20 Robbins RA, Floreani AA, Von Essen SG, et al. *Measurement of exhaled nitric oxide by three different techniques.* Am J Respir Crit Care Med 1996;153:1631-5.
- 21 Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, et al. *The effect of alcohol ingestion on exhaled nitric oxide.* Eur Respir J 1996; 9:1130-3.
- 22 Persson MG, Gustafsson LE. *Ethanol can inhibit nitric oxide production.* Eur Respir J 1992;224:99-100.
- 23 Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. *Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory infections.* Eur Respir J 1995;8:295-7.
- 24 Murphy AW, Platt-Mills TA, Lobo M, et al. *Respiratory nitric oxide levels in experimental human influenza.* Chest 1999;114:452-6.
- 25 Olin AC, Aldenbratt A, Ekman A, et al. *Increased nitric oxide in exhaled air after intake of a nitrate-rich meal.* Respir Med 2001;95:153-8.
- 26 Buchwald F, Barladi E, Carraro S, et al. *Measurements of exhaled nitric oxide in healthy subjects age 4 to 17 years.* J Allergy Clin Immunol 2005;115:1130-6.
- 27 Santamaria F, Montella S, De Stefano S, et al. *Relationship between exhaled nitric oxide and body mass index in children and adolescents.* J Allergy Clin Immunol 2005;115:1163-4.
- 28 Olivieri M, Talamini G, Corradi M, et al. *Reference values for exhaled nitric oxide (re-veno) study.* Respir Res 2006;7:94.
- 29 Bommarito L, Migliore E, Bugiani M, et al. *Exhaled Nitric Oxide in a Population Sample of Adults.* Respiration 2007 Jun 27; [Epub ahead of print].
- 30 Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. *Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics.* Eur Respir J 1993;6:1368-70.
- 31 Adisesh LA, Kharitonov SA, Yates DH, et al. *Exhaled and nasal nitric oxide is increased in laboratory animal allergy.* Clin Exp Allergy 1998;28:876-80.
- 32 Horvath I, Barnes PJ. *Exhaled monoxides in asymptomatic atopic subjects.* Clin Exp Allergy 1999;29:1276-80.
- 33 Frank TL, Adisesh A, Pickering AC, et al. *Relationship between exhaled nitric oxide and childhood asthma.* Am J Respir Crit Care Med 1998;158:1032-6.
- 34 Kharitonov SA, O'Connor BJ, Evans DJ, et al. *Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide.* Am J Respir Crit Care Med 1995;151:1894-9.
- 35 Paredi P, Leckie MJ, Horvath I, et al. *Exhaled carbon monoxide is elevated following allergen challenge in patients with asthma.* Eur Respir J 1999;13:48-52.
- 36 Baraldi E, Carra S, Dario C, et al. *Effect of natural grass pollen exposure on exhaled nitric oxide in asthmatic children.* Am J Respir Crit Care Med 1999;159:262-6.
- 37 Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, et al. *Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma.* Thorax 1998;53:91-5.
- 38 Warke TJ, Fitch PS, Brown V, et al. *Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma.* Thorax 2002;57:383-7.
- 39 van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, et al. *Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma.* Am J Respir Crit Care Med 2001;164:2107-13.
- 40 Payne DN, Adcock IM, Wilson NM, et al. *Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone.* Am J Respir Crit Care Med 2001;164:1376-81.
- 41 Franklin PJ, Turner SW, Le Souef PN, et al. *Exhaled nitric oxide and asthma: complex interactions between atopy, airway responsiveness, and symptoms in a community population of children.* Thorax 2003;58:1048-52.
- 42 Steerenberg PA, Janssen NA, de Meer G, et al. *Relationship between exhaled NO, respiratory symptoms, lung function, bronchial hyperresponsiveness, and blood eosinophilia in school children.* Thorax 2003;58:242-5.

- 43 Langley SJ, Goldthorpe S, Custovic A, et al. *Relationship among pulmonary function, bronchial reactivity, and exhaled nitric oxide in a large group of asthmatic patients.* Ann Allergy Asthma Immunol 2003;91:398-404.
- 44 Kharitonov SA, Yates DH, Robbins RA, et al. *Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients.* Lancet 1994;343:133-5.
- 45 Persson MG, Zetterstrom O, Agrenius V, et al. *Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers.* Lancet 1994;343:146-7.
- 46 Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. *Prospective evaluation of the accuracy of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma.* Am J Respir Crit Care Med 1999;158:A861.
- 47 Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. *Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma.* Chest 2003;123:751-6.
- 48 Smith AD, Cowan JO, Filsell S, et al. *Diagnosing asthma: comparisons between exhaled nitric oxide measurements and conventional tests.* Am J Respir Crit Care Med 2004;169:473-8.
- 49 Kharitonov SA, Barnes PJ, O'Connor BJ. *Reduction in exhaled nitric oxide after a single dose of nebulized budesonide in patients with asthma (abstract).* Am J Respir Crit Care Med 1996;153:A799.
- 50 Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. *Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients.* Am J Respir Crit Care Med 1996;153:454-7.
- 51 Kharitonov SA, Yates DH, Chung KF, et al. *Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients.* Eur Respir J 1996;9:196-201.
- 52 Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, et al. *Exhaled nitric oxide and bronchial reactivity during and after inhaled beclomethasone in mild asthma.* J Asthma 1998;35:473-9.
- 53 Kharitonov SA, Donnelly LE, Montuschi P, et al. *Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma.* Thorax 2002;57:889-96.
- 54 Kharitonov SA, Barnes PJ. *Does exhaled nitric oxide reflect asthma control? Yes, it does!* Am J Respir Crit Care Med 2001;164:727-8.
- 55 Bratton DL, Lanz MJ, Miyazawa N, et al. *Exhaled nitric oxide before and after montelukast sodium therapy in school-age children with chronic asthma: a preliminary study.* Pediatr Pulmonol 1999;28:402-7.
- 56 Straub DA, Minocchieri S, Moeller A, et al. *The effect of montelukast on exhaled nitric oxide and lung function in asthmatic children 2 to 5 years old.* Chest 2005;127:509-14.
- 57 Sandrini A, Ferreira IM, Gutierrez C, et al. *Effect of montelukast on exhaled nitric oxide and nonvolatile markers of inflammation in mild asthma.* Chest 2003;124:1334-40.
- 58 Ghiro L, Zanconato S, Rampon O, et al. *Effect of montelukast added to inhaled corticosteroids on fractional exhaled nitric oxide in asthmatic children.* Eur Respir J 2002;20:630-4.
- 59 Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. *Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma.* N Engl J Med 2005;352:2163-73.
- 60 Delgado-Corcoran C, Kisson N, Murphy SP, et al. *Exhaled nitric oxide reflects asthma severity and asthma control.* Pediatr Crit Care Med 2004;5:48-52.
- 61 Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, et al. *The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control.* Am J Respir Crit Care Med 2001;164:738-43.
- 62 Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. *Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial.* Lancet 2002;360:1715-21.
- 63 Pijnenburg MW, Bakker EM, Hop WC, et al. *Titrating steroids on exhaled nitric oxide in children with asthma: a randomized controlled trial.* Am J Respir Crit Care Med 2005;172:831-6.
- 64 Rutgers SR, van der Mark TW, Coers W, et al. *Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease.* Thorax 1999;54:576-80.
- 65 Von Essen SG, Scheppers LA, Robbins RA, et al. *Respiratory tract inflammation in swine confinement workers studied using induced sputum and exhaled nitric oxide.* J Clin Toxicol 1998;36:557-65.
- 66 Maziak W, Loukides S, Culpitt SV, et al. *Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med 1998;157:998-1002.
- 67 Fujimoto K, Kubo K, Yamamoto H, et al.

- Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema.* Chest 1999;115: 697-702.
- 68 Thomas SR, Kharitonov SA, Scott SF, et al. *Nasal and exhaled nitric oxide is reduced in adult patients with cystic fibrosis and does not correlate with cystic fibrosis genotype.* Chest 2000;117:1085-9.
- 69 Grasmann H, Ioannidis I, Tomkiewicz RP, et al. *Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease.* Arch Dis Child 1998;78:49-53.
- 70 Gaston B, Ratjen F, Vaughan JW, et al. *Nitrogen redox balance in the cystic fibrosis airway: effects of antipseudomonal therapy.* Am J Respir Crit Care Med 2002;165:387-90.
- 71 Grasmann H, Grasmann C, Kurtz F, et al. *Oral L-arginine supplementation in cystic fibrosis patients: a placebo-controlled study.* Eur Respir J 2005;25:62 -8.
- 72 Grasmann H, Gartig SS, Wiesemann HG, et al. *Effect of L-arginine infusion on airway NO in cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia syndrome.* Eur Respir J 1999;13:114-8.
- 73 Meng QH, Springall DR, Bishop AE, et al. *Lack of inducible nitric oxide synthase in bronchial epithelium: a possible mechanism of susceptibility to infection in cystic fibrosis.* J Pathol 1998;184:323-31.
- 74 Kharitonov SA, Wells AU, O'Connor BJ, et al. *Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis.* Am J Respir Crit Care Med 1995;151:1889-93.
- 75 Tracey WR, Xue C, Klinghofer V, et al. *Immunocytochemical detection of inducible NO synthase in human lung.* Am J Physiol 1994;266:L722-L727.
- 76 Ho LP, Innes JA, Greening AP. *Exhaled nitric oxide is not elevated in the inflammatory airways diseases of cystic fibrosis and bronchiectasis.* Eur Respir J 1998;12:1290-4.
- 77 Loukides S, Kharitonov SA, Wodehouse T, et al. *Effect of L-arginine on mucociliary function in primary ciliary dyskinesia.* Lancet 1998;352:371-2.
- 78 Bush A. *Primary ciliary dyskinesia.* Acta Otorhinolaryngol Belg 2000; 54:317-24.
- 79 Cremona G, Higenbottam T, Borland C, et al. *Mixed expired nitric oxide in primary pulmonary hypertension in relation to lung diffusion capacity.* QJM 1994;87:547-51.
- 80 Kharitonov SA, Cailles JB, Black CM, et al. *Decreased nitric oxide in the exhaled air of patients with systemic sclerosis with pulmonary hypertension.* Thorax 1997;52:1051-5.
- 81 Clini E, Cremona G, Campana M, et al. *Production of endogenous nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease and patients with cor pulmonale. Correlates with echo-Doppler assessment.* Am J Respir Crit Care Med 2000;162:446-50.
- 82 Malerba M, Radaeli A, Ragnoli B, et al. *Exhaled nitric oxide levels in systemic sclerosis with and without pulmonary involvement.* Chest 2007;132:575-80.
- 83 Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. *Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med 1997;155:1763-9.
- 84 Paredi P, Kharitonov SA, Loukides S, et al. *Exhaled nitric oxide is increased in active fibrosing alveolitis.* Chest 1999;115:1352-6.
- 85 Fajac I, Kahan A, Menkes CJ, et al. *Increased nitric oxide in exhaled air in patients with systemic sclerosis.* Clin Exp Rheumatol 1998;16:547-52.
- 86 Rolla G, Colagrande P, Scappaticci E, et al. *Exhaled nitric oxide in systemic sclerosis: relationships with lung involvement and pulmonary hypertension.* J Rheumatol 2000;27:1693-8.
- 87 Moodley YP, Laloo UG. *Exhaled nitric oxide is elevated in patients with progressive systemic sclerosis without interstitial lung disease.* Chest 2001;119,1449-54.
- 88 Moodley YP, Chetty R, Laloo UG. *Nitric oxide levels in exhaled air and inducible nitric oxide synthase immunolocalization in pulmonary sarcoidosis.* Eur Respir J 999;14:822-7.
- 89 Piipari R, Piirilä P, Keskinen H, et al. *Exhaled nitric oxide in specific challenge tests to assess occupational asthma.* Eur Respir J 2002;20:1532-7.
- 90 Tunnicliffe WS, Harrison RM, Kelly FJ, et al. *The effect of sulphurous air pollutant exposures on symptoms, lung function, exhaled nitric oxide, and nasal epithelial lining fluid antioxidant concentrations in normal and asthmatic adults.* Occup Environ Med 2003;60:e15.
- 91 Ferguson EA, Eccles R. *Changes in nasal nitric oxide concentration associated with*

- symptoms of common cold and treatment with a topical nasal decongestant.* Acta Otolaryngol 1997;117:614-7.
- <sup>92</sup> Wang CH, Liu CY, Lin HC, et al. *Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages.* Eur Respir J 1998;11:809-15.
- <sup>93</sup> Long R, Light B, Talbot JA. *Mycobacteriocidal action of exogenous nitric oxide.* Antimicrob Agents Chemother 1999;43:403-5.
- <sup>94</sup> Von Essen SG, Scheppers LA, Robbins RA, et al. *Respiratory tract inflammation in swine confinement workers studied using induced sputum and exhaled nitric oxide.* J Clin Toxicol 1998;36:557- 65.
- <sup>95</sup> Grasmann H, Ioannidis I, de Groot H, et al. *Metabolites of nitric oxide in the lower respiratory tract of children.* Eur J Pediatr 1997;156:575-8.
- <sup>96</sup> Liu CY, Wang CH, Chen TC, et al. *Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer.* Br J Cancer 1998; 78:534-41
- <sup>97</sup> Fisher AJ, Gabbay E, Small T, et al. *Cross sectional study of exhaled nitric oxide levels following lung transplantation.* Thorax 1998;53:454-8.
- <sup>98</sup> Brett SJ, Evans TW. *Measurement of endogenous nitric oxide in the lungs of patients with the acute respiratory distress syndrome.* Am J Respir Crit Care Med 1998;157:993-7.
- <sup>99</sup> Ishibe Y, Liu R, Hirosawa J, et al. *Exhaled nitric oxide level decreases after cardiopulmonary bypass in adult patients.* Crit Care Med 2000;28:3823-7.
- <sup>100</sup> Malerba M, Clini E, Cremona G, et al. *Exhaled nitric oxide in patients with PiZZ phenotype-related alpha1-anti-trypsin deficiency.* Respir Med 2001;;95:520-5.
- <sup>101</sup> Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, et al. *Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample.* Chest 2006;130:1319-25.
- <sup>102</sup> Olin AC, Bake B, Torén K. *Fraction of exhaled nitric oxide at 50 mL/s: reference values for adult lifelong never-smokers.* Chest 2007;131:1852-6.

## ESALATO CONDENSATO

Massimo Corradi

Università di Parma, Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Parma

### Introduzione

Il ruolo fisiologico del polmone è lo scambio di ossigeno ed anidride carbonica, ma nell'aria esalata sono presenti anche altre sostanze, sia gassose che non gassose. Tra le sostanze non gassose, distinguiamo sostanze volatili, sostanze non volatili e semivolatili (Tab. I).

Una sostanza chimica è considerata volatile quando ha la tendenza a passare in fase gas. Una sostanza chimica è considerata non volatile quando ha poca tendenza a passare in fase gas. Le caratteristiche intrinseche della sostanza e le condizioni ambientali sono i fattori che ne regolano la volatilità. Esempio di sostanze non gassose ma volatili sono alcuni indicatori di ossidazione lipidica quali l'etano e il pentano<sup>1</sup>. Si tratta di composti la cui tensione di vapore, alla temperatura corporea, determina un facile passaggio in fase gas nell'aria espirata.

Ci sono poi sostanze quali sali e proteine la cui tensione di vapore è bassa a 37°C, quindi hanno difficoltà a raggiungere l'esalato in fase di gas. Queste sostanze sono meno facilmente rilevabili nell'aria espirata e possono essere

espirate in forma di aerosol, ovvero una sospensione di un liquido (o solido) in un gas<sup>2</sup>. Le sostanze gassose (NO, CO) sono, in genere misurate on line, modalità in cui il soggetto espira direttamente entro un analizzatore con risultati immediati.

Riguardo alle sostanze non gassose ma volatili, la loro raccolta è eseguita *off line*, ovvero l'aria esalata è raccolta in appositi contenitori o su fibre assorbenti e successivamente analizzata<sup>3</sup>.

Per la raccolta delle sostanze esalate parzialmente o non volatili, la tecnica più utilizzata è il condensato dell'aria esalata (CAE)<sup>4</sup>.

### Meccanismi di formazione del condensato dell'aria esalata

L'aria esalata che esce dalla bocca ha una temperatura di circa 35°C ed un'umidità del 95%. L'aria esalata è quasi completamente in equilibrio con il vapore acqueo alla temperatura corporea. Quando l'aria esalata impatta su un'altra superficie più fredda della temperatura del vapore acqueo, accade il fenomeno

**Tabella I.** *Classificazione delle sostanze presenti nell'aria espirata.*

|                |   |
|----------------|---|
| <b>Gas</b>     | Monossidi (monossido di azoto, monossido di carbonio) |
| <b>Non gas</b> | Sostanze volatili (etano, pentano, benzene)           |
|                | Sostanze semi volatili (acqua ossigenata)             |
|                | Sostanze non volatili (proteine, sali)                |

della condensazione. La condensazione, quindi, è la formazione d'acqua liquida dal vapore acqueo puro o d'acqua mescolata con aria.

Il CAE è una matrice liquida composta essenzialmente da vapore acqueo condensato. Si stima che la quota di vapore acqueo in esso presente sia di circa 99%. Nel CAE sono anche determinabili numerose sostanze volatili e non volatili biologicamente attive. Il meccanismo con cui le sostanze esalate si ritrovano nel CAE non è del tutto chiaro, tuttavia s'ipotizza che piccole particelle, probabilmente goccioline che si staccano dal film liquido che riveste le vie respiratorie, rimangono in sospensione nell'aria espirata e trasportate all'esterno dalla corrente di vapore espirata.

Il contenuto in acqua dell'aria espirata diminuisce esponenzialmente con il declino della temperatura. A +10°C già l'81,2% del vapore acqueo condensa, mentre a 0°C condensa oltre l'89% di vapore acqueo ed a -10°C condensa circa il 93,7% del vapore acqueo. Un'ulteriore importante riduzione della temperatura, utilizzando per esempio azoto liquido come agente raffreddante non è necessaria, sia perché non porta ad incremento notevole della frazione di condensato, sia perché i costi sarebbero troppo sostenuti rispetto ai benefici. Per ottenere invece una maggiore quantità di condensato, piuttosto che abbassare ulteriormente la temperatura, è meglio e decisamente più conveniente aumentare la superficie di contatto del vapore con la fonte fredda; ciò può essere ottenuto attraverso una migliorata geometria del condensatore.

## Raccolta del condensato dell'aria esalata

La raccolta del CAE presenta numerosi vantaggi (Tab. II): non altera le mucose delle vie aeree e non comporta una variabile diluizione dei campioni, come accade invece per i campioni ottenuti mediante lavaggio broncoalveolare.

I pazienti possono essere studiati a qualunque età ed inoltre il CAE è particolarmente indi-

**Tabella II.** *Vantaggi del condensato dell'aria espirata.*

|                               |
|-------------------------------|
| Raccolta non-invasiva         |
| Semplice e veloce             |
| Applicabile in pazienti gravi |
| Adatta a bambini piccoli      |
| Manovra non flogogena         |
| Matrice acquosa               |
| Non richiede manipolazioni    |

cato per il monitoraggio, mediante misure sequenziali e longitudinali, in quanto non altera la struttura e lo stato funzionale delle basse vie aeree. I dati pubblicati sui mediatori della flogosi indicano che il CAE riflette le anomalie notate in campioni ottenuti mediante broncoscopia. Inoltre, la matrice che si raccoglie è praticamente acqua, quindi bene si presta ad essere analizzata senza manipolazione.

La raccolta del CAE si effettua chiedendo al soggetto di respirare dalla bocca a volume corrente per un tempo prefissato (Fig. 1). Prima e durante la manovra, è necessario un rigoroso risciacquo del cavo orale. L'aria esalata è raffreddata in appositi condensatori. Il volume di CAE ottenuto in 15 minuti di volume corrente è circa 2 ml, tuttavia va ricordato come la ventilazione polmonare sia il principale fattore che regola il volume di CAE prodotto (i due parametri sono fortemente correlati,  $r = 0,9$ ). Un altro fattore molto rilevante è la temperatura di raffreddamento dell'aria esalata, in grado di condizionare quantità e composizione del liquido raccolto. Goldoni et al.<sup>5</sup> hanno dimostrato una chiara relazione inversa tra volume di CAE prodotto e temperatura di raffreddamento, in un range di lavoro da -10° a +5° C. Il maggior volume di condensazione lo si aveva a -10°C, ma a ciò corrispondeva anche una maggiore diluizione del soluto, quindi una concentrazione ridotta.

Risulta pertanto molto utile la possibilità di termostatare la provetta e raccogliere il condensato alla temperatura più opportuna per



- Attendere che la temperatura del condensatore raggiunga  $-5^{\circ}\text{C}$
- Far sedere il soggetto
- Fare risciacquare più volte la bocca
- Fare respirare a volume corrente per 15 minuti
- Ogni 5 minuti risciacquare
- Misurare il volume di CAE

**Figura 1.** *Protocollo di raccolta del condensato d'aria.*

ciascun analista<sup>5</sup>. Tra i condensatori in commercio, solo il TurboDeccs (ItalChill, Parma, Italia) è provvisto di un termostato per il controllo e la regolazione della temperatura. Di recente, Soyer et al.<sup>6</sup> hanno dimostrato come in un altro sistema di raccolta commerciale, Rtube (Respiratory Research Inc., VA), si assiste ad una drammatica riduzione della temperatura di raffreddamento già due minuti dopo il trasferimento del condensatore dal frigorifero alla temperatura ambiente. In un altro condensatore commerciale, EcoScreen (Jaeger, Wurzburg, Germany) la temperatura, al contrario, tende a scendere nel tempo, determinando, quindi, una variabile grado condensazione, con formazione dapprima di CAE liquido, poi di CAE ghiacciato.

Un altro delicato aspetto relativo alla raccolta del CAE consiste nella composizione dei sistemi di raccolta. Nel processo di formazione del CAE, minuscole gocce di fluido polmonare impattano contro la superficie del condensatore, mischiandosi poi al vapore acqueo condensato. Alcune sostanze si possono adsorbire al sistema di raccolta, oppure il siste-

ma di raccolta stesso, anche durante eventuali fasi di sterilizzazione, può rilasciare sostanze interferenti con i meccanismi di analisi del CAE. Risulta, quindi, estremamente importante valutare fenomeni di rilascio e di assorbimento dei sistemi di raccolta utilizzati<sup>7</sup>.

Nella Figura 2 sono riportati i principali condensatori artigianali e presenti sul mercato, con i relativi vantaggi e svantaggi. La ricerca si sta focalizzando verso condensatori sempre più efficienti e dotati di sistemi per il frazionamento dell'aria espirata; questo sistema potrebbe essere molto interessante per la possibilità di campionare solo l'aria proveniente dalle porzioni più distali dell'apparato respiratorio, probabilmente più rappresentativa dei fenomeni legati alle principali malattie polmonari.

È anche possibile raccogliere il CAE in soggetti connessi al ventilatore, posizionando il condensatore in serie al circuito respiratorio. Tuttavia, la presenza dell'umidificatore annesso al ventilatore può determinare una maggiore diluizione del campione.



| Condensatore  | Nome commerciale | Vantaggi  | Svantaggi  |
|---|------------------|---|--|
|  | Non disponibile  | Basso costo<br>Buona efficienza di condensazione<br>Portatile                                   | Non monouso<br>Temperatura non controllata<br>Nessun frazionamento dell'aria esalata<br>Materiale non inerte |
|  | Rube             | Basso costo<br>Portatile<br>Monouso<br>Adattabile al ventilatore                                | Temperatura non controllata<br>Nessun frazionamento dell'aria esalata<br>Costo del monouso                   |
|  | Turbo Decos      | Portatile<br>Costo modesto<br>Monouso<br>Temperatura di raffreddamento costante e regolabile    | Costo del monouso<br>Nessun frazionamento dell'aria esalata  |
|  | EcoScreen        | Adattabile al ventilatore<br>Sistema di raccolta telefonato<br>Semplice raccordo per spirometro | Costo elevato<br>Non monouso<br>Temperatura non controllata<br>Nessun frazionamento dell'aria esalata        |

Figura 2. Condensatori presenti in commercio.

## Analisi del condensato dell'aria esalata

La raccolta del CAE è effettuata per due obiettivi importanti: i) avere informazioni sui meccanismi fisiopatologici nelle vie aeree rilevando i cambiamenti nei livelli dei mediatori; ii) avere informazioni sulla composizione del fluido di rivestimento broncoalveolare.

Sono numerose le sostanze che possono essere valutate nel CAE (Tab. III), tra cui molecole di modeste dimensioni quali perossido d'idrogeno e molecole di dimensioni maggiori quali leucotrieni, prostaglandine, citochine, isoprostani, *markers* tumorali e piccole quantità di DNA.

Le metodiche più utilizzate per la determinazione dei differenti mediatori sono di tipo colorimetrico ed immunoenzimatico. Negli ultimi anni, comunque, al fine di ottenere una maggiore specificità delle analisi, metodiche che utilizzano la cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, sono sempre più spesso utilizzate per le analisi del CAE.

Per la maggior parte delle sostanze determinabili nel CAE, la determinazione può essere fatta sul campione non manipolato. Tuttavia, per l'analisi di alcuni analiti è necessaria una processazione del campione prima dell'ana-

lisi. Alcune sostanze sono piuttosto labili nel CAE, anche se conservate a basse temperature. È il caso del perossido di idrogeno, che va determinato su campioni appena raccolti oppure è necessario aggiungere una sostanza stabilizzante (acido idrossifenilacetico) per una prolungata conservazione del campione<sup>8</sup>. Per l'analisi del pH, è necessario, invece, fare gorgogliare all'interno del CAE un gas inerte (in genere Argon) per alcuni minuti, al fine di rimuovere le sostanze volatili (soprattutto anidride carbonica) e determinare, quindi, l'acidità fissa. Per altre sostanze, quali ad esempio alcune citochine, è spesso necessaria una concentrazione del campione, in genere ottenuta tramite liofilizzazione, al fine di consentire una migliore rilevabilità.

### Applicazioni cliniche

**Acqua ossigenata.** L'acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ) è un valido indicatore di stress ossidativo, che si forma in seguito all'attivazione di radicali liberi. Si tratta di una molecola parzialmente volatile che si determina facilmente nell'aria espirata a concentrazione micromolare ( $\mu M$ ), con rilevazione fluorimetrica<sup>8</sup>.

L' $H_2O_2$  nel CAE è ampiamente utilizzata nell'ambito della ricerca in pneumologia. Una

**Tabella III.** *Principali sostanze determinabili nel CAE, loro significato biologico e modalità di determinazione.*

| Indicatore            | Significato biologico                    | Determinazione   |
|-----------------------|--|------------------|
| Acqua ossigenata      | Generazione di radicali liberi           | Fluorimetria     |
| pH                    | Equilibrio acido base, reflusso gastrico | pHmetro          |
| Eicosanoidi           | Infiemmazione, stress ossidativo         | Immunoenzimatica |
| Aldeidi/isoprostani   | Stress ossidativo                        | LC-MS            |
| Ossidi di azoto       | Stress nitrosoattivo                     | Colorimetrica    |
| Conducibilità (sali)  | Contenuto elettrolitico                  | Conducimetro     |
| Citochine             | Infiemmazione                            | Immunoenzimatica |
| Radicali liberi       | Stress ossidativo                        | EPR              |
| Glutazione            | Stress ossidativo                        | HPLC             |
| DNA                   | Valutazione genetica                     | PCR              |
| Eritropoietina        | Ipossiemia                               | Immunoenzimatica |
| Fattori angiogenetici | Angiogenesi                              | Immunoenzimatica |
| Attività chemotattica | Infiemmazione                            | In vitro         |
| Glucosio              | Glucosio nelle vie aeree                 | CSI              |
| Metalli               | Indicatori di esposizione                | ICPMS            |
| Toluene               | Indicatori di esposizione                | GC-MS            |
| TBARS                 | Stress ossidativo                        | Colorimetrico    |
| Urea                  | Fattore di diluizione                    | HPLC             |
| Adenosina             | Infiemmazione                            | HPLC             |
| N-carboxymethyllysine | Glucossidazione                          | LC-MS            |

Abbreviazioni: LC-MS: cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa; EPR: spettroscopia con risonanza paramagnetica; HPLC: cromatografia liquida ad alta pressione; PCR: reazione polimerasica a catena; ICPMS: spettrometria di massa con sorgente al plasma; CSI: cromatografia a scambio ionico.

prima sua concreta applicazione si è avuta nel 1997, quando Jobsis et al.<sup>9</sup> hanno dimostrato un incremento dei livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel CAE di bambini asmatici rispetto ai soggetti di controllo, indipendentemente dalla presenza di terapia inalatoria con cortisone. Lo stesso gruppo<sup>10</sup> ha poi definito i livelli di normalità in età pediatrica di quest'indicatore, con un intervallo di riferimento da < 0,01 a 0,48 uM. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata anche determinata nel CAE di soggetti con fibrosi cistica. Il gruppo olandese<sup>11</sup> ha rilevato livelli elevati di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel CAE di bambini durante una riacutizzazione di fibrosi cistica, con successiva riduzione dei livelli dopo trattamento antibiotico. Da questi primi dati era, quindi, emerso che condizioni associate ad infiammazione acuta<sup>12</sup> o cronica delle vie aeree sono caratteriz-

zate dalla presenza d'elevati livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esalata, apparentemente non influenzata dalla terapia inalatoria con cortisone, ma ridotti dalla terapia orale con antibiotici.

Ulteriori dati che confermano la validità di questo indicatore nella valutazione dell'asma bronchiale derivano da alcune osservazioni, in base alle quali i livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel CAE correlano negativamente con il VEMS e con la reattività bronchiale<sup>13,14</sup> e positivamente con i livelli di proteina cationica degli eosinofili nell'espettorato<sup>15</sup>. Interessanti dati sono disponibili anche utilizzando l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come *markers* di stress ossidativo nella broncopneumopatia critica ostruttiva (BPCO). Gerritsen et al.<sup>16</sup>, hanno evidenziato l'utilità di questo *markers* in caso di riacutizzazione di BPCO.

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel CAE è stata anche utilizzata per valutare la risposta terapeutica. Ben due lavori<sup>17,18</sup> hanno dimostrato come la terapia con n-acetilcisteina per bocca sia in grado di ridurre i livelli. Infine, una promettente applicazione relativa all'utilizzo di questo indicatore la si ha da un lavoro che evidenzia come i livelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> si riducono contestualmente alla conta neutrofila nel sangue, in seguito a chemioterapia per tumore polmonare<sup>8</sup>.

*Eicosanoidi.* Sono rappresentati da diverse famiglie di sostanze (prostaglandine, trombossani, leucotrieni, lipossine, etc.) derivati dall'acido arachidonico, che hanno la capacità di aumentare le reazioni allergiche, la proliferazione cellulare, la pressione sanguigna, le reazioni infiammatorie, l'aggregazione piastrinica, la trombogenesi e il vasospasmo. I leucotrieni sono le sostanze più spesso determinate nel CAE a concentrazione di picogrammi/ml, sia con metodiche immunoenzimatiche che con spettrometria di massa. I più studiati sono i cisteinil leucotrieni (cLT), ovvero i leucotrieni C4, D4 ed E4, che sono i responsabili della fase ritardata della reazione asmatica, ed il leucotriene B4, un principale metabolita flogogeno prodotti a livello dei granulociti neutrofilii.

Esistono varie evidenze a favore della presenza d'elevati livelli di cLT nel CAE di bambini asmatici<sup>19</sup> con una certa correlazione positiva tra livello del mediatore e gravità clinica<sup>20</sup> ed un ulteriore aumento nei livelli nel corso di riacutizzazione<sup>21</sup>.

I livelli di cLT sembrano, inoltre, essere particolarmente utili per lo studio d'alcune particolari forme d'asma, quali l'asma indotta da esercizio fisico e l'asma da aspirina. Carraro et al.<sup>22</sup> hanno dimostrato come i livelli di cLT nel CAE sono elevati in bambini con asma indotta da esercizio fisico, con una correlazione positiva tra i livelli basali del mediatore e caduta del FEV<sub>1</sub> dopo esercizio. Antczak et al.<sup>23</sup> hanno dimostrato come l'asma indotta da aspirina sia associata ad elevati livelli di cLT nel CAE.

Un'altra interessante applicazione dell'utilizzo del cLT nel CAE di bambini asmatici si è avuta dal gruppo londinese di Lex et al.<sup>24</sup>, i quali hanno mostrato una correlazione positiva tra i livelli espirati di cLT e lo spessore della membrana basale di biopsie bronchiali, proponendo, quindi, questa determinazione come metodo per lo studio del rimodellamento delle vie aeree caratteristico dell'asma bronchiale.

Un altro utilizzo dei cLT nel CAE è la valutazione della risposta farmacologica. Bieracki et al.<sup>25</sup> hanno dimostrato una riduzione tempo dipendente nei livelli di cLT in asmatici dopo terapia con antileucotrieni.

Il leucotriene B4 (LTB-4) è stato anch'esso ampiamente studiato nel CAE di bambini. I livelli di LTB4 sono anch'essi elevati nel CAE di bambini asmatici<sup>26</sup>, ma le principali sue applicazioni riguardano la fibrosi cistica. Bodini et al.<sup>27</sup> hanno mostrato livelli elevati di LTB4 nel CAE di bambini con fibrosi cistica, soprattutto se presente una colonizzazione batterica con *Pseudomonas aeruginosa*.

Di recente, Bonetto et al.<sup>28</sup> hanno pubblicato un interessante articolo concernente la possibilità di utilizzare LTB-4 nel CAE per valutare l'insulto polmonare provocato da sostanze pneumotossiche inalate.

Va comunque ricordato come la determinazione dei leucotrieni nel CAE richieda ancora una attenta validazione, soprattutto relativamente alla loro stabilità.

*pH.* La misura del pH nel CAE ha subito attratto notevole interesse, nell'ipotesi che l'acidificazione polmonare provocata dal processo infiammatorio possa rappresentare un nuovo approccio verso la conoscenza della fisiopatologia polmonare. Nel 2003 Hunt et al. hanno per prima dimostrato come il CAE di soggetti asmatici durante una crisi d'asma sia notevolmente più acido (circa 5) rispetto ai valori di controllo (circa 7,5)<sup>29</sup>. Il pH si determina facilmente nel CAE, sembra essere molto riproducibile<sup>30</sup> e non influenzato dalla produzione orale d'ammoniaca<sup>31</sup>.

Un'acidificazione delle vie aeree è stata anche riportata in soggetti con fibrosi cistica<sup>32</sup>, con un'ulteriore acidificazione durante la riacutizzazione<sup>33</sup>.

Una interessante applicazione della misura del pH nel CAE è stata riportata da Dupont et al.<sup>34</sup>, i quali hanno evidenziato una maggiore acidificazione delle vie aeree nei soggetti trapiantati di tumore che sviluppavano segni di rigetto, rispetto ai soggetti senza segni di rigetto.

Va comunque detto che non è ancora ben chiaro quanto le modifiche di pH che si osservano nel CAE dipendano da una reale alterazione delle vie aeree, oppure non riflettano modifiche della flora batterica orale<sup>35</sup> o la presenza di reflusso gastro-esofageo<sup>36</sup>. Quest'ultimo è un aspetto totalmente nuovo, ma con ampie potenzialità di sviluppo. È noto, infatti, che il reflusso gastro esofageo è in grado di innescare reazioni asmatiche ed episodi di tosse secca persistente. La possibilità di misurare il pH delle vie aeree (sia prossimali che distali) tramite l'analisi del CAE potrebbe aiutare l'orientamento diagnostico nei casi di tosse secca di n.d.d.<sup>36</sup> o di asma bronchiale non ben controllata.

Per i soggetti adulti, è presente un range di normalità del pH nel CAE che va da 7,5 a 7,8<sup>37</sup>.

**NOx.** Vari ossidi di azoto (NOx) sono stati determinati nel CAE, quali nitrati/nitriti, nitrosotoli e nitrotirosina. Nitrati/nitriti sono lievemente elevati nel CAE di bambini asmatici, ma soprattutto si assiste ad un incremento nei loro livelli nei soggetti con fibrosi cistica, in contrapposizione ai livelli di NO che sono quasi diagnosticamente ridotti<sup>38</sup>.

Sembra, inoltre, interessante la possibilità di utilizzare la misura di NOx nella valutazione della risposta polmonare all'immunoterapia specifica, come di recente pubblicato da Inci et al.<sup>39</sup>.

L'applicazione della misura di NOx nel CAE di soggetti con asma bronchiale sembra essere meno promettente rispetto alla determinazione di NO gas; tuttavia, recenti osservazioni sembrano in parte confutare questa

tesi, dimostrando come la determinazione di tutti gli NOx nell'aria esalata, non solo quindi di NO gas, possa permettere una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici associati all'asma bronchiale<sup>40</sup>.

Un altro interessante indicatore di stress nitrosoattivo è la nitrotirosina, prodotta dalla reazione dello NO con l'anione superossido, quindi proposta come indicatore di stress nitrosoattivo. Baraldi et al. hanno evidenziato elevati livelli di nitrotirosina/tirosina nel CAE di bambini asmatici rispetto ai soggetti di controllo<sup>41</sup>.

**8-isoprostano e aldeidi.** Si tratta di validi indicatori di ossidazione lipidica *in vivo*, facilmente determinabili nel CAE. Gli isoprostani sono una famiglia di eicosanoidi di origine non enzimatica prodotta dall'ossidazione casuale dei fosfolipidi dei tessuti. L'ossidazione di questi fosfolipidi è la maggior parte delle volte causata dai radicali liberi dell'ossigeno.

Livelli elevati di 8-isoprostano sono stati determinati nel CAE di soggetti con asma in fase stabile<sup>41</sup>, fibrosi cistica e discinesia ciliare primaria<sup>42,43</sup>. Nell'asma bronchiale, i livelli di 8-isoprostano nel CAE sembrano avere una buona correlazione positiva con la gravità clinica, mentre sembrano relativamente resistenti alla terapia con steroidi inalati<sup>20</sup>.

Riguardo alle differenti aldeidi presenti nel CAE, la malondialdeide (MDA) è la forma più stabile e più clinicamente rilevante. Corradi et al. hanno evidenziato un aumento nei livelli di MDA in bambini asmatici durante una riacutizzazione, ed un rapporto negativo tra livelli di MDA nel CAE e concentrazione di glutazione ridotto<sup>44</sup>.

**Citochine.** La possibilità di determinare citochine nel CAE è sicuramente molto interessante, dato l'enorme rilevanza fisiopatologica che questi indicatori possono avere per la comprensione delle patologie respiratorie. Purtroppo, le concentrazioni delle citochine nel CAE sono molto basse, il che richiede metodi molto sensibili per le analisi, oppure la concentrazione del campione. In un recente lavoro, livelli di diverse citochine a pattern TH1

e TH2 sono state dosate nel CAE di bambini con asma e con fibrosi cistica. IL-2, IL-4, IFN-gamma, e IL-10 erano determinabili nel 16%, 16%, 11%, e 9%, rispettivamente di tutti i campioni di asma e CF. Nei controlli IFN-gamma, TNF-alpha, e IL-10 erano dosabili in 9%, 14%, and 3%, rispettivamente; IL-2, IL-4, and IL-5 non erano determinabili nei controlli<sup>45</sup>.

IL-8 e IL-6 sono più facilmente determinabili nel CAE. Bodini et al. hanno evidenziato come i livelli di IL-8 sono dosabili nel CAE di bambini con fibrosi cistica, ed i rispettivi livelli sono più elevati in quei bambini con colonizzazione batterica delle vie aeree<sup>46</sup>.

**Conducibilità.** La conduttanza (o, più raramente, conducibilità elettrica) è l'espressione quantitativa dell'attitudine di un conduttore ad essere percorso da corrente elettrica. Questo parametro è calcolato nel CAE per stabile la quantità di soluto presente nella soluzione. Il parametro, come tale, non sembra avere un'importanza clinica; la sua utilità, invece, potrebbe derivare dal suo utilizzo come indicatore di diluizione. Infatti, considerando che la maggior parte del CAE è acqua, potrebbe essere utile avere una stima di quanto i soluti in esso presenti siano diluiti, al fine di poter meglio interpretare un'eventuale variazione della concentrazione dell'indicatore selezionato<sup>47</sup>.

### Nuovi indicatori

La letteratura relativa a questo argomento è molto florida, e non passa mese senza che un nuovo articolo sull'argomento venga pubblicato, spesso con presenza di nuovi indicatori rilevabili nel CAE.

Un recente articolo evidenzia come il CAE contenga fattori in grado di chemoattivare neutrofili ed eosinofili e, soprattutto, come questa attività chemoattrattiva risulti essere più elevata nei soggetti sani fumatori rispetto ai non fumatori, con un ulteriore incremento nei fumatori con BPCO<sup>48</sup>.

Sempre nell'ambito degli indicatori di stress ossidativo, Rosias ha dimostrato come nel

CAE siano determinabili radicali liberi, la cui concentrazione sembra essere lievemente più elevata in bambini con fibrosi cistica, rispetto ai controlli<sup>49</sup>.

Promettente sembra anche essere la possibilità di determinare l'eritropoietina nel CAE, soprattutto nell'ottica di studiare pazienti con pneumopatie associate ad ipossiemia<sup>50</sup> o indicatori di glicosazione<sup>51</sup>.

Infine, il CAE si presta molto bene anche per un approccio di tipo omico. Un gruppo italiano ha dimostrato come, tramite risonanza magnetica nucleare accoppiata alla spettrometria di massa, sia possibile identificare uno spettro che chiaramente differenzia soggetti con asma bronchiale dai controlli<sup>52</sup>.

## Conclusioni

I dati pubblicati indicano che il CAE è una metodica di semplice esecuzione e non invasiva, caratteristiche che la rendono facilmente applicabile per lo studio delle patologie polmonari. Di recente sono state pubblicate linee guida e raccomandazioni<sup>54</sup> (vd. Punti chiave) che possono permettere una maggiore standardizzazione della metodica e quindi una più facile confrontabilità dei dati ottenuti nei differenti centri di ricerca.

## PUNTI CHIAVE

### Raccolta del condensato dell'aria esalata

Per una corretta raccolta del CAE è necessario:

- controllo della temperatura di raccolta;
- risciacquo della bocca;
- utilizzo di un sistema di raccolta inerte;
- intrappolare la saliva;
- stabilire una durata di raccolta;
- respirazione a volume corrente con clip nasale;
- registrare il volume di CAE raccolto.

### Analisi del condensato dell'aria esalata

Per una corretta analisi del CAE è necessario:

- escludere la presenza di saliva;
- assicurarsi della stabilità del mediatore;
- validare il tipo di analisi.

## Bibliografia

- 1 Barker M, Hengst M, Schmid J, et al. *Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis*. Eur Respir J 2006;27:929-36.
- 2 Effros RM, Peterson B, Casaburi R, et al. *Epithelial lining fluid solute concentrations in chronic obstructive lung disease patients and normal subjects*. J Appl Physiol. 2005;99:1286-92.
- 3 Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, et al. *Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med 2006;174:6-14.
- 4 Hunt J. *Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease*. J Allergy Clin Immunol 2002;110:28-34.
- 5 Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, et al. *Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters*. BMC Pulm Med 2005;5:10.
- 6 Soyer OU, Dizdar EA, Keskin O, et al. *Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection*. Allergy 2006;61:1016-8.
- 7 Rosias PP, Robroeks CM, Niemarkt HJ, et al. *Breath of condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate*. Eur Respir J 2006;26:1036-41.
- 8 Wewel AR, Crusius JA, Gatzemeier U, et al. *Time course of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide during chemotherapy*. Eur Respir J 2006;27:1033-9.
- 9 Jobsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, et al. *Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children*. Eur Respir J 1997;10:519-21.
- 10 Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, et al. *Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values*. Eur Respir J 1998;12:483-5.
- 11 Jobsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, et al. *Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment*. Eur Respir J 2001;16:95-100.
- 12 Jobsis RQ, Schellekens SL, Fakkkel-Kroesbergen A, et al. *Hydrogen peroxide in breath condensate during a common cold*. Mediators Inflamm 2001;10:351-4.
- 13 Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, et al. *Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients*. Chest 2001;120:1136-9.
- 14 Antczak A, Nowak D, Shariati B, et al. *Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients*. Eur Respir J 1997;10:1235-41.
- 15 Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A, et al. *Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients*. Chest 2001;120:1136-9.
- 16 Gerritsen WB, Asin J, Zanen P, et al. *Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients*. Respir Med 2005;99:84-90.
- 17 De Benedetto F, Aceto A, Dragani B, et al. *Long-term oral n-acetylcysteine reduces exhaled hydrogen peroxide in stable COPD*. Pulm Pharmacol Ther 2005;18:41-7.
- 18 Kasielski M, Nowak D. *Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Med 2001;95:448-56.
- 19 Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B, et al. *Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2002;166:1345-9.
- 20 Zanconato S, Carraro S, Corradi M, et al. *Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma*. J Allergy Clin Immunol 2004;113:257-63.
- 21 Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, et al. *Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations*. Thorax 2003; 58:505-9.
- 22 Carraro S, Corradi M, Zanconato S, et al. *Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes are increased in children with exercise-induced bronchoconstriction*. J Allergy Clin Immunol 2005;115:764-70.
- 23 Antczak A, Montuschi P, Kharitonov S, et al. *Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2002;166:301-6.
- 24 Lex C, Zacharasiewicz A, Payne DN, et al. *Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study*. Respir Res 2006;7:63.
- 25 Biernacki WA, Kharitonov SA, Biernacka HM, et al. *Effect of montelukast on exhaled leukotrienes and quality of life in asthmatic patients*. Chest 2005;128:1958-63.
- 26 Montuschi P, Martello S, Felli M, et al. *Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotriene B4 in asthmatic children*. Respir Res 2005;19:119.

- 27 Bodini A, D'Orazio C, Peroni D, et al. *Biomarkers of neutrophilic inflammation in exhaled air of cystic fibrosis children with bacterial airway infections*. *Pediatr Pulmonol* 2005;40:494-9.
- 28 Bonetto G, Corradi M, Carraro S, et al. *Longitudinal Monitoring of Lung Injury in Children following Chlorine Exposure in a Swimming Pool*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;545-9
- 29 Hunt JF, Fang K, Malik R, et al. *Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:694-9.
- 30 Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, et al. *Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity*. *Eur Respir J* 2003;22:889-94.
- 31 Wells K, Vaughan J, Pajewski TN, et al. *Exhaled breath condensate pH assays are not influenced by oral ammonia*. *Thorax* 2005;60:27-31.
- 32 Ojoo JC, Mulrennan SA, Kastelik JA, et al. *Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis*. *Thorax* 2005;60:22-6.
- 33 Tate S, MacGregor G, Davis M, et al. *Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate*. *Thorax* 2002;57:926-9.
- 34 Dupont LJ, Dewandeleer Y, Vanaudenaerde BM, et al. *The pH of exhaled breath condensate of patients with allograft rejection after lung transplantation*. *Am. J. Transplant.* 2006;6:1486-92.
- 35 Effros RM, Casaburi R, Su J, et al. *The effects of volatile salivary acids and bases on exhaled breath condensate pH*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:386-92.
- 36 Hunt J, Yu Y, Burns J, Gaston B, et al. *Identification of acid reflux cough using serial assays of exhaled breath condensate pH*. *Cough* 2006;11:3.
- 37 Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A, et al. *Normative data for pH of exhaled breath condensate*. *Chest* 2006;129:426-30.
- 38 Formanek W, Inci D, Lauener RP, et al. *Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease*. *Eur Respir J* 2002;19:487-91.
- 39 Inci D, Altintas DU, Kendirli SG, et al. *The effect of specific immunotherapy on exhaled breath condensate nitrite levels*. *Allergy* 2006;61:899-00.
- 40 Nguyen TA, Woo-Park J, Hess M, et al. *Assaying all of the nitrogen oxides in breath modifies the interpretation of exhaled nitric oxide*. *Vascul Pharmacol* 2005;43:379-84.
- 41 Baraldi E, Giordano G, Pasquale MF, et al. *3-Nitrotyrosine, a marker of nitrosative stress, is increased in breath condensate of allergic asthmatic children*. *Allergy* 2006;61:90-6.
- 42 Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, et al. *Exhaled 8-isoprostane in childhood asthma*. *Respir Res* 2005;6:79.
- 43 Zihlif N, Paraskakis E, Tripoli C, et al. *Markers of airway inflammation in primary ciliary dyskinesia studied using exhaled breath condensate*. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41:509-14.
- 44 Corradi M, Folesani G, Andreoli R, et al. *Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation*. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:395-9.
- 45 Robroeks CM, Jobsis Q, Damoiseaux JG, et al. *Cytokines in exhaled breath condensate of children with asthma and cystic fibrosis*. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:349-55.
- 46 Bodini A, D'Orazio C, Peroni D, et al. *Biomarkers of neutrophilic inflammation in exhaled air of cystic fibrosis children with bacterial airway infections*. *Pediatr Pulmonol* 2005;40:494-9.
- 47 Effros RM, Biller J, Foss B, et al. *A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates*. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1500-5.
- 48 Corhay JL, Hemelaers L, Henket M, et al. *Granulocyte Chemotactic Activity in Exhaled Breath Condensate of Healthy Subjects and Patients With COPD*. *Chest.* 2007;131:1672-7.
- 49 Rosias PP, Den Hartog GJ, Robroeks CM, et al. *Free radicals in exhaled breath condensate in cystic fibrosis and healthy subjects*. *Free Radic Res* 2006;40:901-9.
- 50 Schumann C, Triantafilou K, Krueger S, et al. *Detection of erythropoietin in exhaled breath condensate of nonhypoxic subjects using a multiplex bead array*. *Mediators Inflamm* 2006;5:18061.
- 51 Schettgen T, Tings A, Brodowsky C, et al. *Simultaneous determination of the advanced glycation end product N (varepsilon)-carboxymethyllysine and its precursor, lysine, in exhaled breath condensate using isotope-dilution-hydrophilic-interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:2783-91.
- 52 Carraro S, Rezzi S, Reniero F, et al. *Metabonomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:986-90.
- 53 Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, et al. *ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions*. *Eur Respir J* 2005;26:523-48.