

# Marcatori infiammatori nel condensato dell'aria espirata di giovani fumatori sani\*

Kevin W. Garey, PharmD; Melinda M. Neuhauser, PharmD;  
Richard A. Robbins, MD; Larry H. Danziger, PharmD;  
Israel Rubinstein, MD, FCCP

**Introduzione:** Sebbene esista una stretta correlazione tra fumatori di sigaretta da lungo tempo, infiammazione polmonare e BPCO, gli sforzi per identificare la popolazione a rischio di sviluppare BPCO non hanno dato, sino ad ora, risultati soddisfacenti. Per questo, l'indagine non invasiva ed il monitoraggio dei biomarcatori dell'infiammazione polmonare in giovani fumatori sani può essere di aiuto in questo studio.

**Obiettivi dello studio:** Lo scopo di questo studio era quello di determinare la concentrazione delle proteine totali, nitriti, interleukina (IL)-1 $\beta$ , fattore di crescita tumorale (TNF)- $\alpha$  e l'attività chemiotattica dei neutrofili nel condensato dell'aria espirata (EBC) raccolto da giovani studenti sani, fumatori e non fumatori.

**Metodi:** EBC è stato raccolto da 20 volontari (9 non fumatori e 11 fumatori) durante la respirazione a volume corrente per 20 minuti. EBC è stato raccolto anche nei fumatori 30 minuti dopo aver fumato una sigaretta con filtro. La concentrazione delle proteine totali, IL-1 $\beta$  e di TNF- $\alpha$  nell'EBC è stata determinata tramite ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). L'attività chemiotattica dei neutrofili è stata determinata *in vitro* utilizzando la tecnica in cieco.

**Risultati:** La concentrazione delle proteine totali dei nitriti e l'attività chemiotattica dei neutrofili era significativamente aumentata nell'EBC dei fumatori rispetto ai non fumatori ( $p < 0,05$ ). La concentrazione delle proteine totali e dei nitriti nel condensato dei fumatori non variava significativamente subito dopo aver fumato una sigaretta. La concentrazione dell'IL-1 $\beta$  e del TNF- $\alpha$  nell'EBC era simile nei non fumatori e nei fumatori.

**Conclusioni:** La concentrazione di alcuni mediatori dell'infiammazione e dell'attività chemiotattica dei neutrofili era aumentata nell'EBC di giovani fumatori sani. La raccolta e l'analisi dell'EBC può essere utile nella diagnosi precoce dell'infiammazione polmonare indotta dal fumo di sigaretta e l'identificazione della popolazione a rischio di sviluppare BPCO.

(CHEST Edizione Italiana 2004; 1:52-56)

**Parole chiave:** vie aeree; biomarcatori; fumo di sigaretta; citochine; liquido di rivestimento epiteliale; polmone; mediatori; chemotassi neutrofila; test non invasivi

**Abbreviazioni:** EBC = condensato dell'aria espirata; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; HPF = campo ad alto potere; IL = interleuchina; TNF = fattore di necrosi tumorale

È accertato che fumare sigarette per un lungo periodo di tempo è associato all'attivazione a cascata della risposta infiammatoria polmonare che determina un danno tissutale che si manifesta clinicamente con una BPCO.<sup>1</sup> Studi precedenti,<sup>2-5</sup> che avevano utilizzato la broncoscopia ed il BAL, avevano documentato un'alterazione della regolazione delle citochine ed un incremento della concentrazione delle proteine nei polmoni dei fumatori da lungo

tempo. Non è accertato se una risposta infiammatoria è anche presente nei polmoni di giovani individui sani dopo una breve esposizione al fumo di sigaretta.

Questo è importante perché un discreto numero di giovani adulti fuma regolarmente. Di conseguenza, c'è un bisogno urgente di ricercare biomarcatori di precoce infiammazione polmonare legata al fumo di tabacco utilizzando metodi semplici e non invasivi in modo da poter identificare la popolazione a rischio e istituire interventi appropriati.<sup>6</sup>

\*Dall'University of Huston College of Pharmacy (Drs. Garey and Neuhauser), Houston, TX; University of Illinois at Chicago Colleges of Pharmacy and Medicine (Drs. Rubinstein and Danziger), Chicago, IL; and Southern Arizona VA Healthcare Center and the University of Arizona (Dr. Robbins), Tucson, AZ. Questo studio è stato sostenuto in parte da VA Merit Review e dal National Institutes of Health grant HL072323. Manoscritto ricevuto il 13 agosto 2002; revisione accettata l'8 giugno 2003.

La riproduzione di questo articolo è vietata in assenza di autorizzazione scritta dell'American College of Chest Physicians (e-mail: permissions@chestnet.org).

Corrispondenza: Israel Rubinstein, MD, FCCP, Department of Medicine (M/C 719), University of Illinois at Chicago, 840 South Wood St, Chicago, IL 60612-7323; e-mail: IRubinst@uic.edu  
(CHEST 2004; 125:22-26)

Per questo, il condensato dell'aria espirata (EBC) è un nuovo e semplice metodo non invasivo per analizzare i vari composti nelle basse vie aeree.<sup>7-9</sup> Diversi mediatori, come proteine, nitriti e citochine, implicati nella cascata infiammatoria, sono stati ritrovati nell'EBC.<sup>10-12</sup> Questo approccio fornisce in tempo reale, una valutazione longitudinale nello stesso soggetto dei marker di infiammazione nel liquido di rivestimento extracellulare del polmone, facilitando perciò il controllo di questo processo dannoso.

Lo scopo di questo studio era di verificare l'utilità dell'EBC nel monitoraggio dell'estensione dell'infiammazione polmonare nei giovani fumatori sani, determinando la concentrazione delle proteine totali, dei nitriti, dell'interleuchina (IL)-1 $\beta$  e del fattore di necrosi tumorale (TNF)- $\alpha$ , due ubiquitarie citochine pro-infiammatorie che si pensa giochino un ruolo fondamentale nel danno polmonare indotto dal fumo, e dell'attività chemiotattica dei neutrofili nell'EBC raccolto da giovani studenti sani, fumatori e non fumatori.<sup>2,3</sup>

## MATERIALI E METODI

### Soggetti

Nove volontari non fumatori (5 maschi e 4 femmine; età media  $22,9 \pm 1,9$  anni [ $\pm$  DS]) sani e undici volontari sani (5 uomini e 6 donne; età media  $23,4 \pm 0,9$  anni) fumatori di  $2,0 \pm 1,2$  pacchetti/anno sono stati reclutati tra gli studenti dell'Università dell'Illinois di Chicago. Tutti i partecipanti non avevano una storia clinica di patologie respiratorie croniche inclusa asma e BPCO e non avevano sofferto di patologie respiratorie acute nelle 4 settimane precedenti lo studio. Non sono stati eseguiti test biologici per accertare lo stato di non fumatore nei soggetti non fumatori reclutati per lo studio. Questo studio è stato approvato dal Review Board dell'Università dell'Illinois di Chicago e tutti i soggetti hanno sottoscritto il consenso informato per parteciparvi.

### Raccolta dell'EBC

L'EBC è stato raccolto da tutti i 20 partecipanti per 20 minuti alla stessa ora del giorno (dalle 9 alle 10 del mattino). Ai fumatori è stato chiesto quindi di fumare una sigaretta con filtro di loro scelta e 30 minuti dopo è stato raccolto nuovamente l'EBC.

Gli strumenti ed i metodi di raccolta dell'EBC sono stati precedentemente descritti in dettaglio.<sup>10</sup> L'EBC è stato raccolto in un tubo di Teflon perfluoroalcoxi alto 1,5 m e con un diametro interno di 0,5 cm inserito in un contenitore di polistirene riempito di ghiaccio e collegato ad una provetta di polipropilene da 10 mL. Seduti comodamente, i soggetti hanno respirato nell'ambito del volume corrente per 20 min inspirando attraverso il naso ed espirando attraverso la bocca dentro il tubo. Almeno 3 mL di condensato è stato raccolto da tutti i soggetti entro i 20 minuti di tempo richiesti per la prova. I soggetti sono stati istruiti a sigillare completamente il tubo con la bocca, a mantenere la bocca asciutta rimuovendo periodicamente la saliva in eccesso e a riferire ogni evento avverso durante e dopo la raccolta. L'EBC è stato raccolto in una provetta di polipropilene priva di sostanze conservanti e conservato immediatamente (entro 5 min) a  $-70^\circ\text{C}$  sino all'analisi.

### Analisi dell'EBC

Tutti i campioni di EBC sono stati esaminati entro 2 mesi dalla raccolta. È stata determinata in tutti i 31 campioni di EBC raccolti dai 9 non fumatori e dagli 11 fumatori (prima e dopo aver fumato una sigaretta) la concentrazione dell'amilasi come indice di contaminazione del condensato con la saliva. Dopo lo scongelamento, la concentrazione dell'amilasi in 200  $\mu\text{L}$  di condensato è stata determinata in duplicato utilizzando un kit disponibile in commercio (Sigma; St. Louis, MO, USA) tramite spettrofotometria. Il limite più basso di rivelazione del test era di 7 U/mL. La quantità totale di proteine in 100  $\mu\text{L}$  di campione di EBC scongelato è stata determinata in duplicato in conformità al metodo di Bradford<sup>13</sup> utilizzando un kit disponibile in commercio (Pierce; Rockford, IL). La concentrazione dei nitriti in 100  $\mu\text{L}$  di EBC scongelato è stata determinata tramite una reazione di Griess modificata, come precedentemente descritto nel nostro laboratorio.<sup>14</sup> In breve, il campione è stato incubato con nitrato reductasi di *Escherichia coli* (0,5 U/mL) a temperatura ambiente per 10 minuti per convertire i nitrati in nitriti nel campione sottoposto al test. Dopodiché un volume equivalente di reagente di Griess è stato aggiunto e incubato a temperatura ambiente per 10 minuti. L'assorbanza è stata determinata a 540 nm utilizzando uno spettrofotometro. La concentrazione dei nitriti in ogni singolo campione è stata determinata in duplicato utilizzando un lettore di micropiastre ELISA automatizzato e termoregolato.

La concentrazione di IL-1 $\beta$  e del TNF- $\alpha$  in 100- $\mu\text{L}$  di campione di EBC scongelato è stata determinata in duplicato tramite ELISA utilizzando kit disponibili in commercio seguendo le istruzioni del produttore (R&D Systems; Minneapolis, MN) utilizzando un lettore di micropiastre ELISA automatizzato e termoregolato. Il limite più basso di rivelazione per l'IL-1 $\beta$  e per il TNF- $\alpha$  era di 2 pg/mL con variazioni tra test e entro test  $< 5\%$ . In studi preliminari abbiamo determinato che il recupero di IL-1 $\beta$  e di TNF- $\alpha$  esogeni aggiunti all'EBC e conservati per due mesi a  $-70^\circ\text{C}$  era entro la riproducibilità delle misurazioni (dati non mostrati).

In un momento diverso, l'EBC è stato raccolto da quattro non fumatori e da quattro fumatori. L'attività chemiotattica dei neutrofili è stata determinata utilizzando piastre da microchemiassi con 48 pozzetti (Neuroprobe; Cabin John, MD) in precedenza descritti.<sup>15-16</sup> Il fondo delle cellule è stato riempito con 25  $\mu\text{L}$  di condensato scongelato testato in triplicato. Filtri di policarbonato privo di polivinilpirrolidone, di 10  $\mu\text{m}$  di spessore e con pori di 3  $\mu\text{m}$ , sono stati posti sopra i pozzetti. Una guarnizione di silicone è stata applicata nella parte superiore della piastra e 50  $\mu\text{L}$  di cellule in sospensione sono stati posti nei pozzetti. Le piastre sono state incubate in aria umidificata al 5% di  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  per 30 minuti. Le cellule non migrate sono state fermate dal filtro. Il filtro è stato immerso in metanolo per 5 minuti, colorato con la colorazione di Wright modificata ed è stato posto su di un vetrino. Le cellule migrate attraverso il filtro sono state contate utilizzando un microscopio ottico. La chemiotassi è stata espressa come numero medio di cellule per campo ad alto potere (HPF).

### Analisi statistica dei dati

I dati sono stati espressi come valori medi  $\pm$  DS dove appropriato. Il confronto tra fumatori (prima e dopo aver fumato) e i non fumatori è stato eseguito utilizzando l'analisi della varianza di Kruskal-Wallis e il test di Mann-Whitney per il confronto appaiato in quanto i dati non erano distribuiti normalmente. La correlazione di Pearson è stata utilizzata per determinare le variabili. È stato utilizzato un pacchetto software statistico (SYSTAT Version 7.0; SYSTAT Software; Richmond, CA, USA). La significatività statistica è stata definita come  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

Nessun effetto avverso è stato riscontrato durante lo svolgimento dello studio. Il volume dell'EBC raccolto dai 20 partecipanti a questo studio era di 3-5 mL. L'amilasi non è stata rilevata in alcuni dei 31 campioni di EBC raccolti dai fumatori prima e dopo aver fumato una sigaretta e dai non fumatori. La concentrazione delle proteine totali nell'EBC era significativamente più bassa nei non fumatori ( $5,7 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$ ) rispetto ai fumatori, prima ( $28,8 \pm 35,8 \mu\text{g/mL}$ ) e dopo aver fumato una sigaretta ( $25,9 \pm 33,9 \mu\text{g/mL}$ ; Figura 1;  $p < 0,05$ ). La concentrazione delle proteine totali era simile prima e dopo aver fumato una sigaretta. La concentrazione dei nitriti nell'EBC era significativamente più bassa nei non fumatori ( $16,156 \pm 7,029 \text{ nmol/L}$ ) rispetto ai fumatori prima ( $24,672 \pm 7,534 \text{ nmol/L}$ ) o dopo ( $23,043 \pm 4,051 \text{ nmol/L}$ ) aver fumato una sigaretta ( $p < 0,05$ ). Non è stata rilevata una significativa differenza nella concentrazione dei nitriti prima e dopo aver fumato una sigaretta.

La concentrazione di IL-1 $\beta$  nell'EBC è risultata simile nei non fumatori e nei fumatori prima e dopo aver fumato una sigaretta ( $1,5 \pm 1,0 \text{ pg/mL}$  e  $1,6 \pm 1,8 \text{ pg/mL}$  rispettivamente;  $p > 0,5$ ). Comunque, la con-

centrazione di IL-1 $\beta$  nell'EBC diminuiva significativamente dopo aver fumato una sigaretta rispetto ai non fumatori (Figura 2;  $p < 0,05$ ). La concentrazione del TNF- $\alpha$  nell'EBC risultava più alta nei fumatori prima di fumare rispetto ai non fumatori ( $7,4 \pm 17,5 \text{ pg/mL}$  vs  $3,9 \pm 8,5 \text{ pg/mL}$  rispettivamente;  $p < 0,05$ ). La concentrazione di TNF- $\alpha$  aumentava dopo aver fumato una sigaretta sebbene la differenza non fosse statisticamente significativa. L'attività chemiotattica dei neutrofili era aumentata nell'EBC dei fumatori rispetto ai non fumatori (Figura 3;  $n = 4$ ;  $p < 0,05$ ). I fumatori mediamente mostravano  $98 \pm 38$  cellule per HPF, mentre i non fumatori mostravano mediamente  $43 \pm 6$  cellule per HPF.

## DISCUSSIONE

In questo studio ci sono tre nuovi dati. Primo, abbiamo trovato che la concentrazione delle proteine totali e dei nitriti era significativamente aumentata nell'EBC dei giovani fumatori sani rispetto ai non fumatori. La concentrazione media delle proteine aumentava più di cinque volte ( $5,7$  vs  $28,8 \mu\text{g/mL}$ ) e la concentrazione dei nitriti era  $> 50\%$  ( $16156$  vs

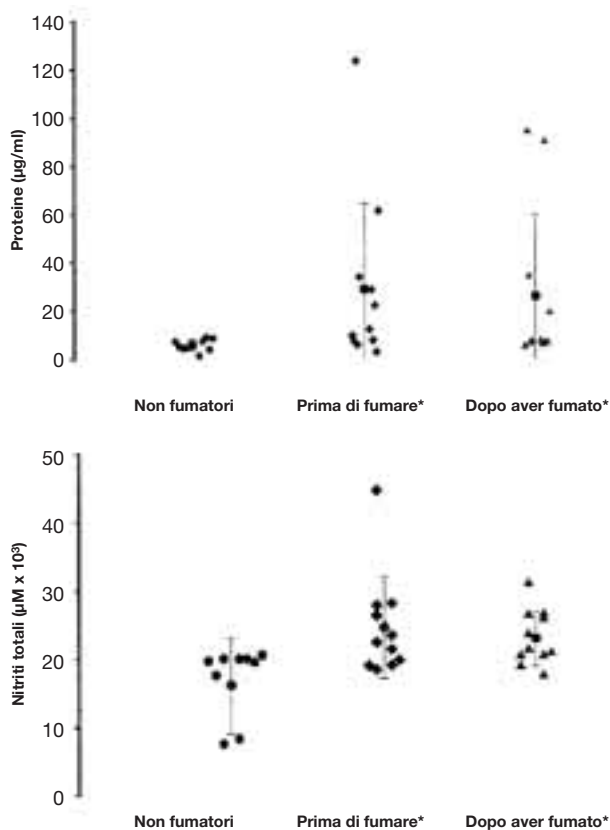


FIGURA 1. Concentrazione delle proteine totali e dei nitriti nei fumatori e nei non fumatori. \* $p < 0,05$  quando comparati con i non fumatori.

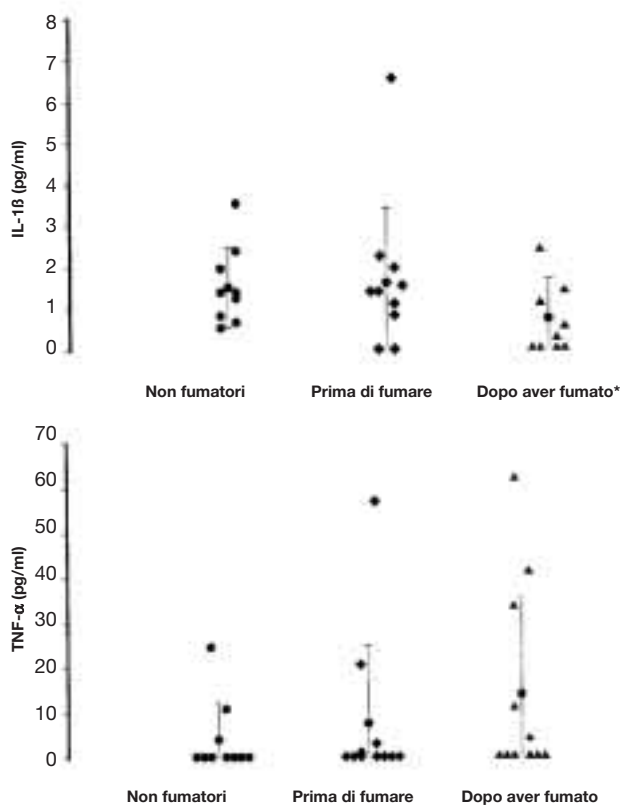


FIGURA 2. Concentrazione dell'IL-1 $\alpha$  e TNF- $\beta$  nei fumatori e nei non fumatori. \* $p < 0,05$  quando comparati con i non fumatori.

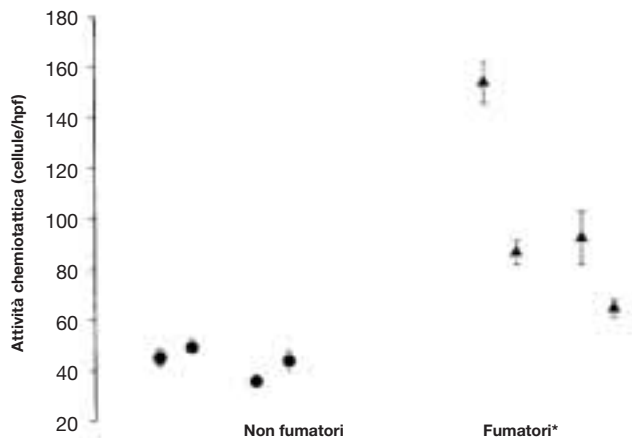


FIGURA 3. Attività chemiotattica nei fumatori e nei non fumatori. \* $p < 0,05$  quando comparati con i non fumatori.

24672 nmol/L) nei fumatori rispetto ai non fumatori della stessa età. Secondo, il fumo di una singola sigaretta era associato ad una riduzione significativa della concentrazione dell'IL-1 $\beta$  nell'EBC. Sebbene la pertinenza di questa nuova osservazione con le patologie polmonari indotte dal fumo sia incerta, ciò può predisporre i fumatori ad infezioni polmonari ricorrenti dato il ruolo chiave dell'IL-1 $\beta$  nel combattere l'invasione dei patogeni.<sup>17-19</sup>

Infine, l'attività chemiotattica dei neutrofili è risultata ridotta nell'EBC dei giovani fumatori sani rispetto ai non fumatori. Questa è una importante osservazione in quanto è accertato che il fumo di sigaretta e la BPCO sono associati con l'infiammazione delle vie aeree caratterizzata da un'intensa infiltrazione di neutrofili nella mucosa delle vie aeree.<sup>4,5,20</sup> Questa risposta aberrante osservata nell'EBC può rappresentare un metodo funzionale per rivelare precocemente un danno polmonare potenzialmente reversibile nei giovani fumatori sani. Certamente, sono richiesti ulteriori studi per caratterizzare l'attività chemiotattica rilevata nell'EBC dei giovani fumatori, incluso il ruolo della nicotina, e gli effetti che la cessazione del fumo ha su questa risposta.

I mediatori dell'infiammazione rilevati nell'EBC in questo studio provengono dalle regioni sottoglottidee per la mancanza di contaminazione salivare.<sup>7,21</sup> Non è accertato se provengano dalle vie aeree e/o dal parenchima polmonare. È possibile che l'incremento della concentrazione dei nitriti nell'EBC possa essere dovuto alla presenza degli stessi nel fumo di tabacco. Comunque, questa possibilità sembra improbabile dato che la concentrazione di nitriti nell'EBC dei fumatori non è aumentata dopo aver fumato una sigaretta.

Gli effetti del fumo di sigaretta sulla concentrazione di IL-1 $\beta$  e del TNF- $\alpha$  nel BAL sono stati precedentemente studiati.<sup>2,3,21</sup> Ad esempio, Brown e

coll.<sup>3</sup> hanno ottenuto macrofagi alveolari da volontari sani costituiti da non fumatori, fumatori moderati (< 10 pacchetti/anno) e forti fumatori (> 10 pacchetti/anno). Similmente ai nostri risultati, l'IL-1 $\beta$  rilasciata dai macrofagi alveolari stimolati con lipopolisaccaridi era significativamente aumentata nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori. Nello studio di Brown e coll.,<sup>3</sup> l'IL-1 $\beta$  rilasciata dai macrofagi stimolati nei fumatori moderati mostrava valori intermedi rispetto ai forti fumatori, il che è suggestivo di un effetto cumulativo del fumo di sigaretta.

Contrariamente ai nostri risultati, McCrea e coll.<sup>2</sup> dimostravano un minor rilascio di TNF- $\alpha$  dai macrofagi alveolari stimolati con lipopolisaccaridi da soggetti fumatori rispetto ai non fumatori; comunque, questi autori non hanno studiato gli effetti del fumo nei giovani individui come abbiamo fatto noi. Sono necessari ulteriori studi per valutare gli effetti iniziali del fumo sulla concentrazione dell'IL-1 $\beta$  e del TNF- $\alpha$  nell'EBC.

È accertato che i metaboliti dell'ossido nitrico, potente mediatore proinfiammatorio, sono contenuti nel fumo di sigaretta. Nonostante ciò, abbiamo rilevato che il fumo di una singola sigaretta non determina un incremento della concentrazione dei nitriti e dei nitrati nell'EBC di giovani adulti fumatori. Viceversa, Balint e coll.<sup>22</sup> hanno dimostrato che il fumo di sigaretta è associato ad un incremento transitorio di questi metaboliti nell'EBC di giovani fumatori. Inoltre, essi hanno rilevato una differenza non significativa della concentrazione dei nitriti e dei nitrati nell'EBC nei non fumatori e nei fumatori. In più, Corradi e coll.<sup>23</sup> hanno dimostrato che la concentrazione dei nitrati era aumentata più di sei volte nell'EBC di giovani fumatori, ma non nei pazienti affetti da BPCO, rispetto ai soggetti non fumatori utilizzati come controllo. Sebbene siano incerte le ragioni della discrepanza di questi risultati, noi abbiamo studiato soggetti con una breve storia di fumo rispetto agli studi di Balint e coll.<sup>22</sup> È possibile che gli effetti del fumo di sigaretta, sui metaboliti dell'ossido nitrico nei giovani fumatori sani, possano manifestarsi precocemente nel corso dell'esposizione, mentre gli altri agenti ossidanti possono essere prodotti in seguito. Certamente, sono necessari studi più approfonditi, come ad esempio includere i soggetti esposti al fumo passivo, per accettare o rifiutare queste ipotesi.

In conclusione, abbiamo dimostrato che la concentrazione di alcuni mediatori dell'infiammazione e dell'attività chemiotattica dei neutrofili sono aumentate nell'EBC di giovani fumatori sani. La raccolta e l'analisi dell'EBC può essere di aiuto nella precoce diagnosi di infiammazione polmonare indotta dal fumo e per identificare la popolazione a rischio di acquisire una BPCO.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Roth MD, Arora A, Barsky SH, et al. Airway inflammation in young marijuana and tobacco smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:928–937
- 2 McCrea KA, Ensor JE, Nall K, et al. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:696–703
- 3 Brown GP, Iwamoto GK, Monick MM, et al. Cigarette smoking decreases interleukin 1 release by human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1989; 256:C260–C264
- 4 Gotoh T, Ueda S, Nakayama T, et al. Protein components of bronchoalveolar lavage fluids from non-smokers and smokers. *Eur J Respir Dis* 1983; 64:369–377
- 5 Morrison D, Strieter RM, Donnelly SC, et al. Neutrophil chemokines in bronchoalveolar lavage fluid and leukocyte-conditioned medium from nonsmokers and smokers. *Eur Respir J* 1998; 12:1067–1072
- 6 Wechsler H, Rigotti NA, Gledhill-Hoyt J, et al. Increased levels of cigarette use among college students: a cause for national concern. *JAMA* 1998; 280:1673–1678
- 7 Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, et al. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:731–737
- 8 Ho LP, Faccenda J, Innes JA, et al. Expired hydrogen peroxide in breath condensate of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 1999; 13:103–106
- 9 Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, et al. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55:205–209
- 10 Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53:680–684
- 11 Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:813–816
- 12 Nowak D, Kasielski M, Pietras T, et al. Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD. *Monaldi Arch Chest Dis* 1998; 53:268–273
- 13 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1975; 72:248–254
- 14 Onyuksel H, Ikezaki H, Patel M, et al. A novel formulation of VIP in sterically stabilized micelles amplifies vasodilation in vivo. *Pharm Res* 1999; 16:155–160
- 15 Hatipoglu U, Gao X, Verral S, et al. Sterically stabilized phospholipids attenuate human neutrophils chemotaxis *in vitro*. *Life Sci* 1998; 63:693–699
- 16 Sato E, Simpson KL, Grisham MB, et al. Inhibition of MIP-1 $\alpha$ -induced human neutrophil and monocyte chemotactic activity by reactive oxygen and nitrogen metabolites. *J Lab Clin Med* 2000; 135:161–169
- 17 Wewers MD, Diaz PT, Wewers ME, et al. Cigarette smoking in HIV infection induces a suppressive inflammatory environment in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1543–1549
- 18 Sher ME, Bank S, Greenberg R, et al. The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5:73–78
- 19 Ouyang Y, Virasch N, Hao P, et al. Suppression of human IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  production by cigarette smoke extracts. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:280–287
- 20 Bridges RB, Wyatt RJ, Rehm SR. Effects of smoking on inflammatory mediators and their relationship to pulmonary dysfunction. *Eur J Respir Dis Suppl* 1986; 146:145–152
- 21 Dandrea T, Tu B, Blomberg A, et al. Differential inhibition of inflammatory cytokine release from cultured alveolar macrophages from smokers and non-smokers by NO<sub>2</sub>. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16:577–588
- 22 Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, et al. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* 2001; 56:456–461
- 23 Corradi M, Pesci A, Casana R, et al. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide* 2003; 8:26–30