



## studi clinici

# Influenza dell'età sulle conte cellulari differenziali dell'espettorato indotto nei soggetti normali\*

Rebecca A. Thomas, MB; Ruth H. Green, MD; Chris E. Brightling, PhD;  
Surinder S. Biring, MD; Debbie Parker, BSc (Hons); Andrew J. Wardlaw, MD;  
Ian D. Pavord, DM

**Obiettivi dello studio:** L'induzione dell'espettorato è usata in modo crescente come una tecnica di ricerca e come uno strumento clinico. Allo scopo di valutare risultati anormali, i valori di normalità devono essere precisamente riconosciuti. Nonostante un numero di studi abbia già descritto i valori di normalità, nessuno ha valutato l'effetto dell'età del soggetto su questi risultati. Questo studio è stato intrapreso per verificare se vi siano differenze età-correlate nelle conte cellulari differenziali in una popolazione di normali, sani volontari.

**Disegno dello studio e partecipanti:** I campioni di espettorato indotto sono stati ottenuti da 66 soggetti non fumatori, sani (24 maschi) con un'età media di 44 anni (range dell'età da 18 a 74 anni). Le conte cellulari differenziali sono state correlate con l'età.

**Risultati:** Le conte dei neutrofili dell'espettorato sono state riscontrate correlare in modo significativo con l'età dei volontari ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,001$ ). Le conte dei macrofagi hanno mostrato una proporzionata correlazione inversa con l'aumento dell'età ( $p < 0,001$ ), ma nessuna correlazione è stata trovata con qualsiasi altro tipo cellulare. Nella subanalisi secondo i valori dell'età, la conta media differenziale dei neutrofili è aumentata dal 26,9% (DS, 19,8%) [17 pazienti] nel gruppo di pazienti tra i 0 e 29 anni al 68,5% (DS, 20,6%) [11 pazienti] nel gruppo di pazienti con > 60 anni di età.

**Conclusioni:** Nella nostra popolazione di volontari sani, la conta differenziale dei neutrofili sull'espettorato indotto aumenta significativamente con l'età. Questi riscontri sottolineano la necessità della stratificazione per età negli studi controllati.

(CHEST Edizione Italiana 2005; 1:5-8)

**Parole chiave:** età; conte cellulari differenziali dell'espettorato indotto

I primi studi sull'aspetto microscopico dell'espettorato e sul suo uso nella pratica clinica sono stati compiuti almeno 50 anni fa.<sup>1</sup> Nell'ultima

\*Dall'Institute for Lung Health, Department of Respiratory Medicine, Glenfield Hospital, University of Leicester NHS Trust, Leicester, UK.

Il Dott. Thomas ha ricevuto un supporto economico dal Wellcome Trust e dall'Università di Leicester NHS Trust. Lo studio è stato finanziato da Astra Zeneca, dalla National Asthma Campaign e dalla British Lung Foundation.

Manoscritto ricevuto il 17 marzo 2004; revisione accettata il 15 luglio 2004.

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

Corrispondenza: Ian Pavord, DM, Department of Respiratory Medicine, Glenfield Hospital, Groby Rd, Leicester LE3 9QP, UK; e-mail: ian.pavord@uhl-tr.nhs.uk

(CHEST 2004; 126:1811-1814)

decade la tecnica si è evoluta in un metodo semplice, sicuro, valido, ripetibile e non invasivo per misurare l'infiammazione delle vie aeree nella pratica clinica e nella ricerca. Gli studi iniziali hanno evidenziato le caratteristiche delle cellule infiammatorie riscontrate in varie malattie respiratorie,<sup>2-4</sup> con piccoli coorti di soggetti usati come popolazione sana. Come la tecnica è diventata più standardizzata e validata,<sup>5,6</sup> diversi autori hanno descritto i valori di normalità in un'ampia popolazione di adulti sani.<sup>7,8</sup> Belda e coll.<sup>7</sup> hanno raccolto campioni di espettorato indotto per un totale di 118 adulti sani non-fumatori, con età compresa tra i 18 e i 60 anni (età media 36 anni), mentre in un secondo studio<sup>8</sup> l'espettorato indotto è stato ottenuto da 114 volontari sani con un'età media di 38 anni. È stata eseguita una sottoanalisi per differenze di sesso, ma l'effetto

dell'età dei soggetti non è stato riportato. Noi abbiamo voluto investigare gli effetti dell'età sulle conte cellulari differenziali nell'espettorato in una popolazione di adulti sani.

## MATERIALI E METODI

### Popolazione in studio

Le conte cellulari differenziali sull'espettorato indotto sono state ottenute da 66 adulti sani con età compresa tra i 18 e i 74 anni (media 44 anni; DS 16 anni). Tutti erano correntemente non-fumatori con un'anamnesi < 5 pacchetti-anno e 24 erano uomini. Nessun paziente riportava sintomi di malattie respiratorie e tutti avevano dei valori di FEV<sub>1</sub> > 70% del teorico, un rapporto FEV<sub>1</sub>/FVC > 80% e una normale responsività delle vie aeree (cioè una concentrazione provocativa di metacolina in grado di produrre una riduzione del FEV<sub>1</sub> del 20% ≥ 16 mg/mL).

### Disegno dello studio

I soggetti sani di controllo sono stati reclutati nello studio nell'arco di un periodo di 6 anni. Per ognuno di loro è stata ottenuta una dettagliata anamnesi ed i soggetti sono stati esclusi se riferivano un qualsiasi sintomo espiratorio o avevano una storia di patologia respiratoria. Tutti i soggetti avevano un punteggio da 0 a 100 secondo la scala analogica del sintomo globale respiratorio.<sup>9</sup> La spirometria è stata eseguita con uno spirometro (Spirometro Compact; Vitalograph; Buckinghamshire, UK). Il test alla metacolina è stato eseguito secondo il metodo del respiro corrente<sup>10</sup> con raddoppio di dosi di metacolina (da 0,03 a 16 mg/mL) somministrate con un nebulizzatore Wright.

L'espettorato è stato indotto e processato come già precedentemente descritto.<sup>5</sup> Brevemente, soluzioni saline del 3%, 4% e 5% sono state inalate in sequenza, ognuna per 5 min, tramite un nebulizzatore ultrasonico (Medix; Ilarlow, UK) a basso-flusso (0,9 mL/min; diametro medio delle particelle 5 µm), 10 minuti dopo l'inalazione di 200 µg di salbutamolo. L'espettorato indotto è stato raccolto e processato entro due ore dall'espettorazione. I tappi nell'espettorato sono stati separati e mescolati con ditio-treitolo allo 0,1%. Dopo la processazione e la preparazione con lo citospin, le conte cellulari differenziali sono state ottenute dopo incubazione con incubatore Romanowsky.

### Analisi statistica

Tutte le analisi sono state eseguite con un software statistico pacchetti-età (SPSS-pc, versione 10,1; SPSS; Chicago, IL). Tutte le conte cellulari differenziali seguivano una normale distribuzione, così sono state espresse come media (DS) e la correlazione è stata eseguita usando il coefficiente di correlazione di Pearson.

## RISULTATI

La conta cellulare differenziale media nell'espettorato con DS per la popolazione totale e suddivisa per l'età è mostrata nella Tabella 1. C'è stata una significativa, positiva correlazione tra l'aumento dell'età e la conta dei neutrofili nell'espettorato nella popolazione totale (r = 0,58); p < 0,001 [Figura 1] e quando analizzata separatamente per sesso (femmine: r = 0,57; p = 0,001; maschi: r = 0,60; p < 0,01). L'aumento nella conta dei neutrofili dell'espettorato è stato particolarmente evidente nel gruppo di soggetti con età compresa tra 50 e 59 anni e non sembrava aumentare al di sotto di questa età (Tabella 1). C'è stata una proporzionata riduzione dei macrofagi con l'età (r = -0,58; p < 0,01), ma nessuna correlazione è stata vista per gli altri tipi cellulari.

## DISCUSSIONE

Noi abbiamo visto che la conta cellulare differenziale neutrofila aumentava con l'età nei soggetti normali adulti. L'effetto è stato visto nella sottopopolazione sia maschile che femminile ed era più evidente nei soggetti di età > 50 anni. Un andamento simile a quello delle conte neutrofile dell'espettorato di aumentare con l'età è stato riportato nei pazienti con asma.<sup>11</sup> I nostri risultati suggeriscono che questo effetto non sia malattia specifico, anche se ulteriori studi che dimostrino l'effetto dell'età sulle conte neutrofiliche dell'espettorato su altre categorie patologiche sono richiesti per essere sicuri

**Tabella 1—Conte cellulari differenziali e conta cellulare totale per soggetti tutti insieme e suddivisi per età\***

Variabile	Popolazione totale	Gruppo d'età, anni				
		0-29	30-39	40-49	50-59	60+
N. soggetti	66	17	12	13	13	11
Maschi, N.	24	9	4	3	2	6
Neutrofili, %	47,0 (27,0)	26,9 (19,8)	38,4 (19,2)	40,4 (25,2)	69,3 (20,8)	68,5 (20,6)
Linfociti, %	1,0 (1,4)	1,0 (1,0)	1,1 (1,3)	0,8 (1,1)	0,6 (0,7)	1,5 (2,8)
Eosinofili, %	0,3 (0,6)	0,5 (0,8)	0,2 (0,5)	0,3 (0,3)	0,2 (0,3)	0,3 (0,6)
Macrofagi, %	49,0 (25,2)	65,6 (17,8)	59,5 (16,7)	56,6 (25,2)	27,6 (20,2)	28,5 (18,5)
Cellule epiteliali, %	2,5 (3,2)	3,3 (3,2)	1,5 (1,6)	2,3 (1,6)	2,5 (4,4)	2,4 (4,4)
Conta cellulare totale, X 10 <sup>6</sup> cullule/mL	2,1 (2,36)	2,9 (2,5)	2,1 (1,5)	1,5 (1,0)	1,6 (1,5)	2,3 (4,1)

\*Valori espressi come media (DS) se non indicato diversamente.

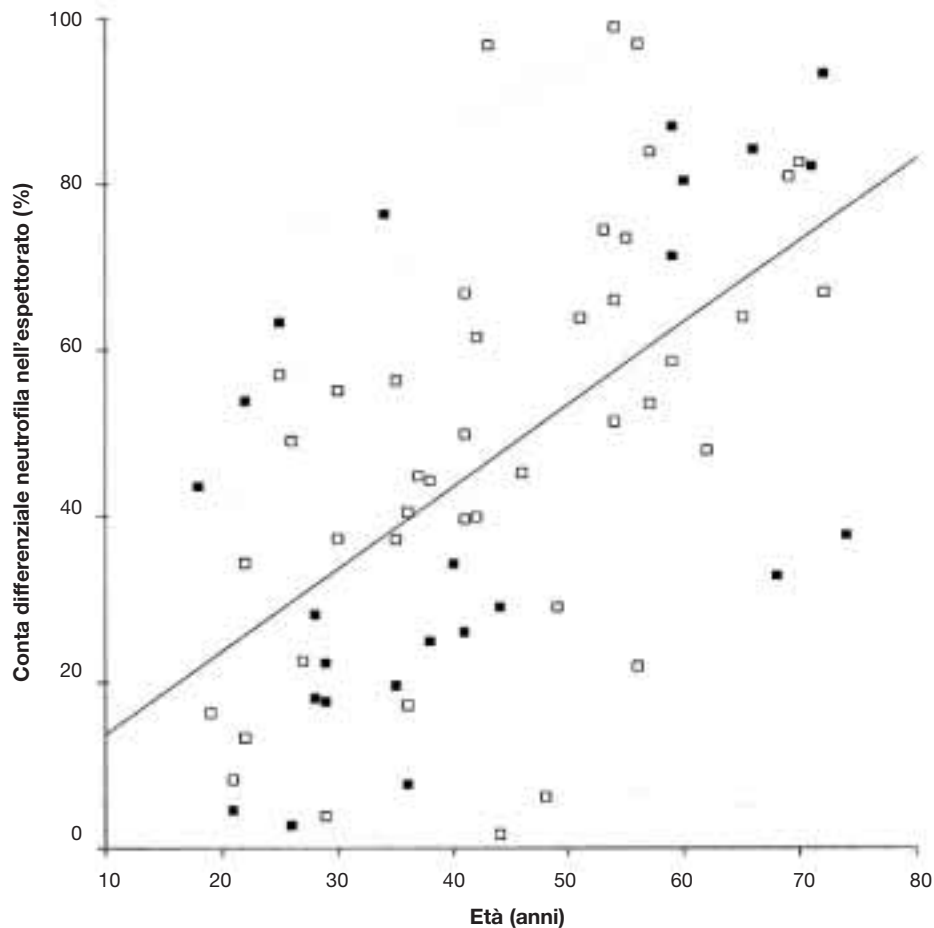


FIGURA 1. Relazione tra la conta differenziale neutrofila nell'espettorato e l'età. ■ = pazienti maschi; □ = pazienti femmine; linea retta = regressione media.

su questo punto. L'effetto dell'età sulle conte cellulari dell'espettorato ha importanti implicazioni per l'interpretazione delle conte cellulari differenziali nei soggetti più anziani e dei risultati delle ricerche in una popolazione più anziana.

Due studi<sup>7,8</sup> hanno precedentemente stimato i valori normali per le conte cellulari differenziali dell'espettorato in ampie popolazioni di soggetti sani. Entrambi gli studi hanno esaminato più di 100 soggetti, ma nessuno ha riportato un significativo effetto dell'età. Tuttavia, entrambi gli studi hanno incluso relativamente pochi soggetti con un'età > 50 anni, pertanto un effetto dell'età potrebbe essere stato perso, in particolare i nostri dati suggeriscono che l'effetto dell'età è principalmente evidente nei soggetti che hanno un'età > 50 anni. Il nostro studio è stato anche limitato ad un piccolo numero di soggetti nella fascia di età più elevata, ma l'effetto riscontrato sembra essere ampio e quindi probabilmente reale. Tuttavia, studi più ampi sono richiesti per dare una risposta più completa a questo importante quesito.

Perché l'età dei soggetti condiziona la conta cellulare differenziale in questo modo? L'effetto potrebbe essere correlato alla difficoltà nel reclutare una popolazione realmente sana a questa età, anche se noi pensiamo che il nostro criterio sia realizzabile e possa essere ampiamente accettato. Tuttavia, è possibile che malattie lievi, subcliniche siano presenti in qualcuno della popolazione dei nostri pazienti, forse anche come risultato di una lunga esposizione ambientale. Ci possono anche essere variazioni legate all'età nella risposta immunitaria del polmone, poiché le percentuali nel BAL dei linfociti CD4+ e del rapporto CD4+/CD8+ aumentano nella quinta decade,<sup>12</sup> particolarmente nelle donne. Concettualmente, questo può determinare un'amplificazione della risposta immunitaria all'ambiente e ad altri stimoli. Tuttavia, l'effetto dell'età visto nel nostro studio non è stato confinato alle femmine, suggerendo che sia improbabile che questo meccanismo sia di fondamentale importanza nell'aumentare le conte neutrofile. Un'altra possibilità è che l'effetto dell'età sulla conta neutrofila dell'espettorato sia dovuto a

differenze età-correlate nella vitalità dopo espettorazione. Ulteriori studi sono richiesti per valutare questa possibilità. È importante enfatizzare che un qualsiasi di tali effetti probabilmente sia determinante in altri studi dato che noi abbiamo usato metodi standardizzati per indurre e processare l'espettorato.<sup>5</sup>

I nostri risultati hanno importanti implicazioni per l'interpretazione degli obiettivi di ricerca. Studi precedenti hanno riportato un aumento delle conte cellulari differenziali neutrofili nei pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva<sup>13</sup> e con tosse idiomatica cronica.<sup>14</sup> Tuttavia, le popolazioni di controllo non erano ben incrociate per età, suggerendo che queste osservazioni possano rappresentare un artefatto. I nostri rilievi sottolineano l'importanza di una attenta stratificazione per età nei futuri studi comparativi.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 Brown HM. Treatment of chronic asthma with prednisolone. *Lancet* 1958; 1245-1247
- 2 Fahy JW, Lim J, Wong H, et al. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1126-1131
- 3 Gibson PG, Girgis-Gabardo A, Morris MM, et al. Cellular characteristics of sputum from patients with asthma and chronic bronchitis. *Thorax* 1989; 44:693-699
- 4 Hargreave FE, Popov T, Kidney J, et al. Sputum measurements to assess airway inflammation in asthma. *Allergy* 1993; 48:81-83
- 5 Pavord ID, Pizzichini MMM, Pizzichini E, et al. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax* 1997; 52:498-450
- 6 Pizzichini E, Pizzichini MMM, Ethimiadis 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; 154:308-317
- 7 Belda J, Leigh R, Parameswaran K, et al. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:475-478
- 8 Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, et al. Induced sputum cellularity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1172-1174
- 9 Brightling CE, Monterio W, Green RH, et al. Induced sputum and other outcome measures in chronic obstructive pulmonary disease: safety and repeatability. *Respir Med* 2001; 95:999-1002
- 10 Juniper EF, Cockcroft DW, Hargreave FE. Histamine and methacholine inhalation tests: a laboratory tidal breathing protocol. 2nd ed. Lund, Sweden: Astra Draco AB, 1994
- 11 Woodruff PG, Khashayar R, Lazarus SC, et al. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness and obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:753-758
- 12 Mund E, Christensson B, Larsson K, et al. Sex dependent differences in physiological ageing in the immune system of lower airways in healthy non-smoking volunteers: study of lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid and blood. *Thorax* 2001; 56:450-455
- 13 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: 530-534
- 14 Jatakanon A, Lalloo UG, Lim S, et al. Increased neutrophils and cytokines, TNF-alpha and IL-8, in induced sputum of non-asthmatic patients with chronic dry cough. *Thorax* 1999; 54:234-237

## ACCP / Capitolo Italiano / Congresso Nazionale

**4-6 maggio 2006**  
**Napoli**  
**Città della Scienza**



**Tel. 081 401201 - Fax 081 404036 - E-mail: [gp.congress@tin.it](mailto:gp.congress@tin.it)**