

Uso dell'esalato condensato nello studio dell'infiammazione aerea dopo challenge con soluzione salina ipertonica*

Giovanna E. Carpagnano, MD; M.P. Foschino Barbaro, MD, FCCP;
M. Cagnazzo, MD; G. Di Gioia, MD; T. Giliberti, MD; C. Di Matteo;
O. Resta, MD, FCCP

Obiettivo dello studio: L'inalazione di una soluzione salina ipertonica sembra poter produrre un'infiammazione delle vie aeree.

Disegno dello studio: Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare questa ipotesi dosando marker infiammatori, nell'esalato condensato raccolto prima e dopo induzione dell'espettorato con soluzione salina ipertonica e isotonica.

Pazienti e metodi: Abbiamo arruolato nello studio 10 pazienti con asma, 10 con BPCO e 7 soggetti sani con anamnesi negativa per malattie dell'apparato respiratorio. Sono state misurate le concentrazioni di interleuchina (IL)-6 e del tumor necrosis factor (TNF)- α sull'esalato condensato con uno specifico kit immunoenzimatico. Il pH dell'esalato è stato misurato dopo dearea- zione con argon (350 mL/min) per 10 minuti, utilizzando un pHmetro.

Misurazioni e risultati: Le concentrazioni dell'IL-6 e del TNF- α sono risultate più elevate mentre il pH si abbassava rispetto ai valori basali in ogni gruppo dei soggetti studiati dopo inalazione di una soluzione salina ipertonica. Non è stata invece osservata alcuna modificazione dopo inalazione di una soluzione salina isotonica. Le concentrazioni dell'IL-6 e del TNF- α e il pH nell'esalato condensato sono risultati correlati tra di loro.

Conclusioni: I risultati di questo studio suggeriscono che l'inalazione di una soluzione salina ipertonica possa causare un'infiammazione di lieve entità delle vie aeree e che il dosaggio dei marker infiammatori quali l'IL-6, il TNF- α e il pH nell'esalato condensato possa essere utile per accertare e monitorare questa flogosi.

(CHEST Edizione Italiana 2005; 4:23-30)

Parole chiave: infiammazione delle vie aeree; asma; BPCO; interleuchina-6; pH; tumor necrosis factor- α

Abbreviazioni: EC = esalato condensato; IL = interleuchina; TNF = tumor necrosis factor

La soluzione salina ipertonica è normalmente usata per l'induzione dell'espettorato.¹ L'espettorato indotto è una metodica largamente utilizzata per lo studio dell'infiammazione bronchiale grazie alla sua non invasività, semplicità, relativa sicurezza, economicità e riproducibilità.^{2,3} La conta cellulare e il profilo citochinico sono infatti comunemente misurati nell'espettorato indotto per accertare lo stato infiammatorio delle basse vie aeree.^{2,3}

La possibilità che l'inalazione di una soluzione salina ipertonica possa causare infiammazione è stata in passato sospettata.⁴ Sono state infatti trovate, dopo induzione dell'espettorato con soluzione salina ipertonica, broncostruzione, aumentata reattività bronchiale alla metacolina così come aumentata produzione di cellule e citochine infiammatorie.⁴

L'esalato condensato è un metodo completamente non invasivo che serve ad ottenere campioni che riflettono la composizione del liquido che ricopre le vie aeree.^{5,6} In confronto ad altre metodiche, la raccolta e l'analisi dell'esalato condensato non influenza la composizione del campione.⁶ Molti marker sono stati misurati nell'esalato condensato per studiare l'infiammazione delle vie aeree come l'interleuchina (IL)-4,⁷ l'interferone (INF)- α ,⁷ il tumor necrosis factor (TNF)- α ,⁸ l'IL-6,⁵ il leucotriene B₄,⁶ e il pH.⁷

Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare l'effetto infiammatorio dell'ipertonicità. A questo fine, abbiamo misurato due citochine solubili che

*Dall'Istituto di Malattie Respiratorie (Dott. Carpagnano, Barbaro, Cagnazzo e Di Matteo), Università di Foggia; e dall'Istituto di Malattie Respiratorie (Dott. Di Gioia e Resta), Università di Bari, Italia.

Manoscritto ricevuto il 13 novembre 2004; revisione accettata il 9 maggio 2005.

La riproduzione di questo articolo è vietata in assenza di autorizzazione scritta dell'American College of Chest Physicians (www.chestjournal.org/misc/reprints.shtml).

Corrispondenza: Giovanna E. Carpagnano, MD, Via De Nicolò 5, 70121, Bari, Italy; e-mail: ge.carpagnano@unifg.it

(CHEST 2005; 128:3159-3166)

hanno un ruolo centrale nell'infiammazione delle vie aeree, l'IL-6 e il TNF- α , e il più promettente tra i marker infiammatori, il pH, nell'esalato condensato di soggetti prima e dopo l'induzione dell'espettorato indotto con soluzione salina ipertonica e isotonica.

Abbiamo inoltre confrontato la composizione cellulare dell'espettorato indotto in un piccolo gruppo di soggetti sani dopo inalazione di soluzione salina sia ipertonica che isotonica. Per valutare il potenziale ruolo di stimolazione dell'inalazione di una soluzione salina ipertonica sull'infiammazione delle vie aeree abbiamo arruolato pazienti appartenenti a tre gruppi caratterizzati da differenti gradi di infiammazione delle vie aeree: pazienti con asma, pazienti con broncopatia cronica ostruttiva (BPCO) e soggetti sani.

MATERIALI E METODI

Popolazione in studio

La popolazione studiata consisteva in 10 pazienti con asma, 10 pazienti con BPCO e 7 controlli sani con anamnesi negativa per malattie dell'apparato respiratorio (Tabella 1). Entrambi i gruppi di pazienti e i controlli erano caucasici e furono arruolati presso la Divisione di Malattie dell'Apparato Respiratorio dell'Università di Foggia. Il consenso informato è stato ottenuto in tutti i soggetti arruolati. Lo studio è stato approvato del Comitato Etico Istituzionale. La diagnosi di asma e la valutazione della sua gravità sono state fatte all'arruolamento in accordo al "Global Initiative for Asthma guidelines".⁹ La diagnosi di BPCO è stata fatta in accordo al "Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease guidelines".¹⁰

Durante lo studio, sono stati permessi solo β_2 -agonisti short-acting per via inalatoria onde alleviare la sintomatologia clinica. Gli steroidi per via inalatoria o per os sono stati sospesi almeno due settimane prima dell'arruolamento allo studio. Nessun paziente ha riportato un'anamnesi positiva per infezioni respiratorie delle alte vie aeree nelle precedenti 4 settimane.

Alla prima visita, tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame obiettivo, a test di funzionalità respiratoria, a valutazione dello stato atopico e al test alla metacolina. Due giorni dopo, sono stati

Tabella 1—Caratteristiche dei soggetti*

Caratteristiche	BPCO	Asmatici	Soggetti sani
Numero	10	10	7
Età (anni)	62 \pm 6	47 \pm 10	42 \pm 5
Sesso (M/F)	6/4	4/6	5/2
FEV ₁ (% del predetto)	75,0 \pm 6,9	65,9 \pm 9,8	112 \pm 18%
FVC (% del predetto)	85,5 \pm 6,9	72,7 \pm 6,5	119 \pm 9%
PD ₂₀ ADVANCE, μ 1 (mcg)	> 1.600	553 \pm 362	> 1.600

*I valori sono espressi come media \pm DS. Definizioni e abbreviazioni: BPCO: broncopatia cronica ostruttiva; FEV₁ = volume espiratorio forzato nel primo secondo; FVC = capacità vitale forzata; PD₂₀ = dose provocativa di metacolina in grado di causare una riduzione del 20% del FEV₁.

sottoposti all'inalazione di una soluzione salina ipertonica (NaCl 4,5%) [seguita dalla procedura di induzione dell'espettorato], preceduta e seguita dalla raccolta dell'esalato condensato (entro 15 minuti dall'inalazione della soluzione salina). Dopo 1 settimana, alla stessa ora del giorno, un piccolo gruppo di questi soggetti (5 pazienti con asma, 5 pazienti con BPCO e 5 soggetti sani) è stato sottoposto all'inalazione di una soluzione salina isotonica (NaCl 0,9%). L'espettorato indotto è stato raccolto in questi soggetti, dopo inalazione sia della soluzione salina ipertonica che isotonica.

Disegno dello studio

Questo studio è stato disegnato per studiare l'effetto dell'inalazione di una soluzione salina ipertonica sull'infiammazione delle vie aeree attraverso l'analisi dell'esalato condensato.

Inalazione della soluzione salina ipertonica e isotonica

Il FEV₁ e l'FVC sono stati misurati prima e 10 minuti dopo l'inalazione di salbutamolo (2 puff, 200 μ g). I soggetti hanno poi inalato una soluzione salina ipertonica (4,5%) o isotonica (0,9%) nebulizzata a tempi crescenti di 1, 2, 4, 8 e 16 minuti, in accordo con Spanevello e coll.¹¹ Il FEV₁ è stato ripetuto 1 minuto dopo ogni inalazione.¹¹ La soluzione salina è stata nebulizzata con un nebulizzatore ad ultrasuoni (DeVilbiss 65; DeVilbiss Corporation; Somerset, PA).

Espettorato indotto

L'espettorato è stato raccolto in un piccolo gruppo di pazienti (5 con asma, 5 con BPCO e 5 sani) sottoposti all'inalazione di soluzione salina ipertonica e poi isotonica. L'espettorato indotto è stato processato secondo Spanevello e coll.¹¹

La conta cellulare è stata fatta in cieco alle caratteristiche cliniche. È stato definito adeguato un espettorato selezionato nel quale ci fossero meno del 20% di cellule squamose e una vitalità superiore al 50%.

Accertamento dello stato atopico

Lo skin-prick test per aeroallergeni è stato eseguito ed interpretato come in precedenza.¹²

Test bronchiale alla metacolina

Il test di stimolazione bronchiale alla metacolina è stato eseguito in tutti i soggetti arruolati allo studio secondo Sterk e coll.¹³ 2 giorni prima dell'inalazione della soluzione salina. Il test bronchiale è stato eseguito in tutti i soggetti alla stessa ora del giorno e nelle stesse condizioni ambientali.

Funzionalità respiratoria

I test di funzionalità respiratoria sono stati eseguiti durante la prima visita e prima dell'inalazione della soluzione salina, utilizzando lo spirometro della Sensor-Medics (Yorba Linda, CA).

Esalato condensato

L'esalato condensato è stato raccolto usando un condensatore (EcoScreen; Jaeger; Wurzburg, Germany). Ai soggetti è stato chiesto di respirare a volume corrente, con una frequenza normale, attraverso un boccaglio collegato ad una valvola di non

ritorno a due vie, indossando uno stringinaso per 10 minuti. I soggetti sono stati avvisati di ingoiare la saliva qualora ne avessero avuta percezione in bocca. L'esalato condensato, almeno 1 ml, è stato raccolto sotto forma di ghiaccio a -20°C , aliquotato in provette Eppendorf e trasferito immediatamente dopo a -70°C . I campioni sono stati analizzati entro 3 mesi dalla raccolta. Per escludere una possibile contaminazione salivare, nell'esalato condensato è stata analizzata l'attività dell'amilasi.

Misurazioni del TNF- α e della IL-6

Uno specifico test immunoenzimatico (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI) è stato usato per misurare le concentrazioni del TNF- α e della IL-6 nell'esalato condensato. La variabilità intere e intra-campione sono state $\leq 10\%$. Il limite di misura dei test è stato rispettivamente di 1,5 pg/mL e 1,5 pg/mL. La riproducibilità delle ripetute misurazione del TNF- α e della IL-6 nell'esalato condensato è stata confermata con il test di Bland e Altman e dal coefficiente di variazione.¹⁴

Misurazione del pH

Un pH stabile è stato ottenuto in tutti i casi dopo deareazione del campione con argon (350 mL/min) per 10 minuti, come precedentemente riportato.¹⁵ Il pH è stato poi misurato entro 5 minuti dalla raccolta dell'esalato condensato con un pHmetro (Corning 240; Corning, Science Products Division; Acton, MA) che ha un range da 0,00 a 14,00 e una risoluzione/accuratezza dell'ordine di $0,01 \pm 0,02$.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm ES. Il test di Mann-Whitney è stato usato per confrontare i gruppi. Il test di correlazione dei ranghi di Spearman è stato utilizzato per correlare le variabili. È stata considerata significativa una $p < 0,05$.

RISULTATI

L'inalazione di una soluzione salina ipertonica e isotonica è stata eseguita senza osservare alcun significativo effetto collaterale o una riduzione del FEV₁ $> 20\%$. Ripetute misure del FEV₁ non hanno mostrato una significativa riduzione dopo ogni periodo di inalazione. Tutti i soggetti asmatici sono risultati atopici (positivi agli allergeni perenni) e positivi al test di stimolazione bronchiale alla metacolina (la dose $[\pm DS]$

di provocazione di metacolina che ha causato la caduta del FEV₁ del 20% è stata di $553 \pm 362 \mu\text{g}$).

Espettorato indotto

Non è stata osservata alcuna differenza fra l'inalazione della soluzione isotonica o ipertonica, nella qualità dei campioni di espettorato ottenuti, giudicando sulla base della vitalità delle cellule e dall'estensione della contaminazione con cellule squamose. Inoltre, non sono state osservate differenze statisticamente significative fra conta cellulare totale e differenziale tra l'espettorato indotto con soluzione salina ipertonica e isotonica (Tabella 2).

IL-6

L'IL-6 è risultata misurabile nei campioni di esalato condensato di tutti i soggetti arruolati. Le concentrazioni di base di IL-6 nell'esalato condensato erano significativamente più alte negli asmatici e nei pazienti con BPCO che nei soggetti sani ($p < 0,001$). Abbiamo osservato più alte concentrazioni di questa citochina dopo inalazione di soluzione salina ipertonica rispetto alle concentrazioni di base sia negli asmatici ($8,1 \pm 1,9 \text{ pg/mL}$ vs $7,3 \pm 1,5 \text{ pg/mL}$, $p < 0,01$) sia nei pazienti con BPCO ($7,8 \pm 1,2 \text{ pg/mL}$ vs $7,0 \pm 1,2 \text{ pg/mL}$, $p < 0,05$) sia nei soggetti sani ($3,9 \pm 0,9 \text{ pg/mL}$ vs $3,1 \pm 0,7 \text{ pg/mL}$, $p < 0,01$) [Figura 1]. Tuttavia, le concentrazioni di IL-6 esalata non hanno mostrato alcun incremento dopo l'inalazione di una soluzione salina isotonica ($6,8 \pm 1,7 \text{ pg/mL}$ vs $6,9 \pm 1,3 \text{ pg/mL}$).

Le concentrazioni di IL-6 nell'esalato condensato correlavano positivamente con il TNF- α ($r = 0,7$, $p < 0,001$) e negativamente con il pH ($r = 0,5$, $p < 0,01$). Le modificazioni dell'IL-6 dalle concentrazioni di base fra asmatici ($0,9 \pm 0,3$), BPCO ($1,6 \pm 0,6$) e soggetti sani ($1,0 \pm 0,2$) sono risultate non significative, con un intervallo di confidenza del 95%.

La riproducibilità delle misurazioni dell'IL-6 nell'esalato condensato è stata testata in 10 soggetti sani non fumatori (6 maschi, età media 35 ± 7 anni).

Tabella 2—Conta cellulare totale e differenziale nell'espettorato indotto*

Variabili	Asmatici (NaCl 0,9%)	Asmatici (NaCl 4,5%)	BPCO (NaCl 0,9%)	BPCO (NaCl 4,5%)	Soggetti sani (NaCl 0,9%)	Soggetti sani (NaCl 4,5%)
Conta cellule totali $\times 10^6/\text{mL}$	$2,7 \pm 0,9$	$2,9 \pm 1,8$	$3,2 \pm 2,8$	$3,3 \pm 1,2$	$2,7 \pm 1,5$	$2,6 \pm 2,4$
Macrofagi (%)	$62,3 \pm 5,1$	$64,2 \pm 6,9$	$45,3 \pm 17,2$	$42,3 \pm 9,9$	$76,1 \pm 16$	$73,7 \pm 12$
Neutrofili (%)	$21,1 \pm 6,6$	$20,6 \pm 4,6$	$39,0 \pm 5,4$	$40,4 \pm 8,3$	$16,1 \pm 6,8$	$19,3 \pm 8,3$
Eosinofili (%)	$6,9 \pm 3,4$	$7,3 \pm 2,9$	$1,4 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$
Linfociti (%)	$1,1 \pm 2,8$	$0,9 \pm 3,4$	$2,4 \pm 1,4$	$2,1 \pm 3,7$	$1,1 \pm 2,1$	$1,7 \pm 3,7$
Cellule epiteliali (%)	$9,9 \pm 2,6$	$8,1 \pm 2,9$	$12,1 \pm 2,7$	$13,0 \pm 3,3$	$12,7 \pm 3,7$	$11,1 \pm 3,7$

*I valori sono espressi come media \pm DS.

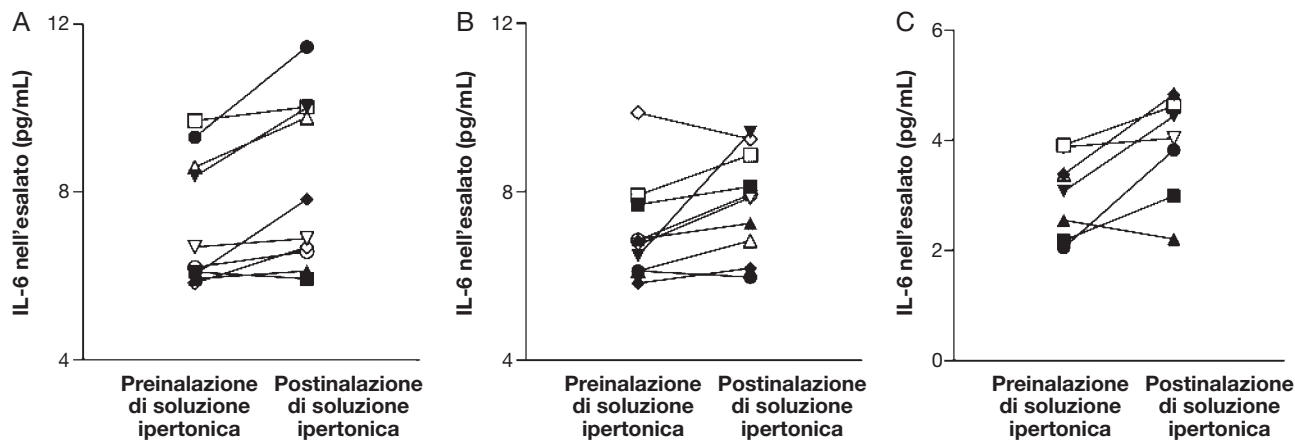


FIGURA 1. Concentrazioni di IL-6 nell'esalato condensato di pazienti asmatici (A), BPCO (B) e soggetti sani (C) prima e dopo l'inalazione di una soluzione salina ipertonica.

Nella maggioranza delle misurazioni, la differenza tra 2 valori di IL-6 rimaneva tra ± 2 DS (differenza media $0,03 \pm 0,24$ pg/mL). Il coefficiente di variazione misurato per l'IL6 è stato di 5,9%.

TNF- α

Il TNF- α è risultato misurabile nei campioni di esalato condensato di tutti i soggetti arruolati. Le concentrazioni di base di TNF- α nell'esalato condensato sono significativamente più alte negli asmatici e nei pazienti con BPCO che nei soggetti sani ($p < 0,001$). Abbiamo osservato più alte concentrazioni di TNF- α dopo inalazione di soluzione salina ipertonica rispetto alle concentrazioni di base sia negli asmatici ($9,4 \pm 2,0$ pg/mL vs $7,8 \pm 0,7$ pg/mL, $p < 0,05$) sia nei pazienti con BPCO ($9,1 \pm 1,6$ pg/mL vs $8,2 \pm 1,3$ pg/mL, $p = 0,1$), sia nei soggetti sani ($4,9 \pm 0,5$ pg/mL vs $4,2 \pm 0,6$ pg/mL, $p < 0,005$)

[Figura 2]. Tuttavia, le concentrazioni di TNF- α esalato non hanno mostrato alcun incremento dopo l'inalazione di una soluzione salina isotonica ($7,3 \pm 1,6$ pg/mL vs $7,4 \pm 1,8$ pg/mL). Le concentrazioni di TNF- α nell'esalato condensato correlavano negativamente con il pH ($r = -0,6$, $p < 0,005$) e negativamente con il pH ($r = 0,5$, $p < 0,01$).

Le modificazioni del TNF- α dalle concentrazioni di base fra asmatici ($1,8 \pm 0,6$), BPCO ($1,5 \pm 0,3$) e soggetti sani ($0,7 \pm 0,1$) sono risultate non significative, con un intervallo di confidenza del 95%. La riproducibilità delle misurazioni del TNF- α nell'esalato condensato è stata testata in 10 soggetti sani non fumatori (6 maschi, età media 35 ± 7 anni). Nella maggioranza delle misurazioni, la differenza tra 2 valori di TNF- α rimaneva tra ± 2 DS (differenza media $0,07 \pm 0,19$ pg/mL). Il coefficiente di variazione misurato per il TNF- α è stato di 3,3%.

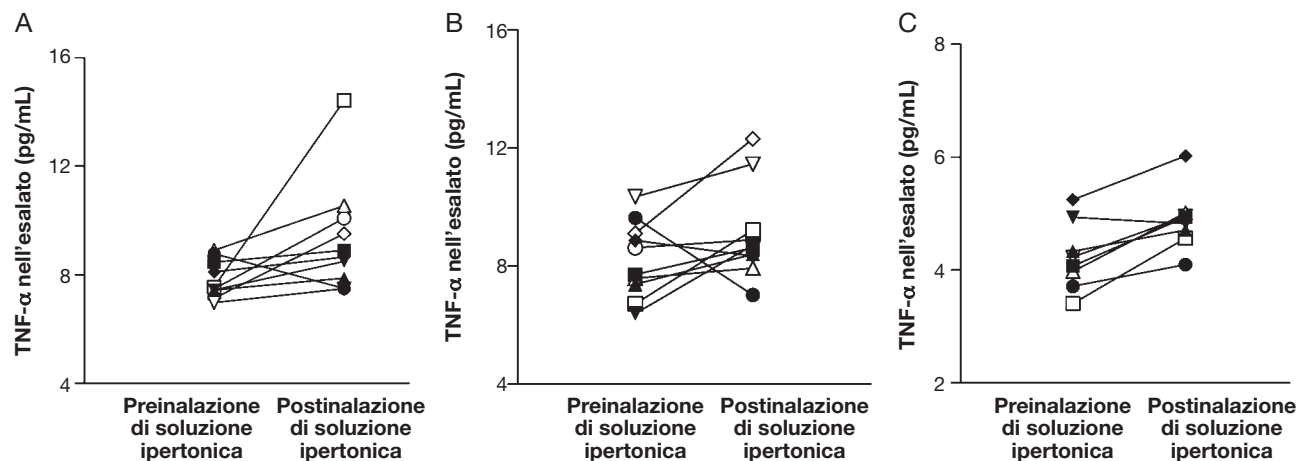


FIGURA 2. Concentrazioni del TNF- α nell'esalato condensato di pazienti asmatici (A), BPCO (B) e soggetti sani (C) prima e dopo l'inalazione di una soluzione salina ipertonica.

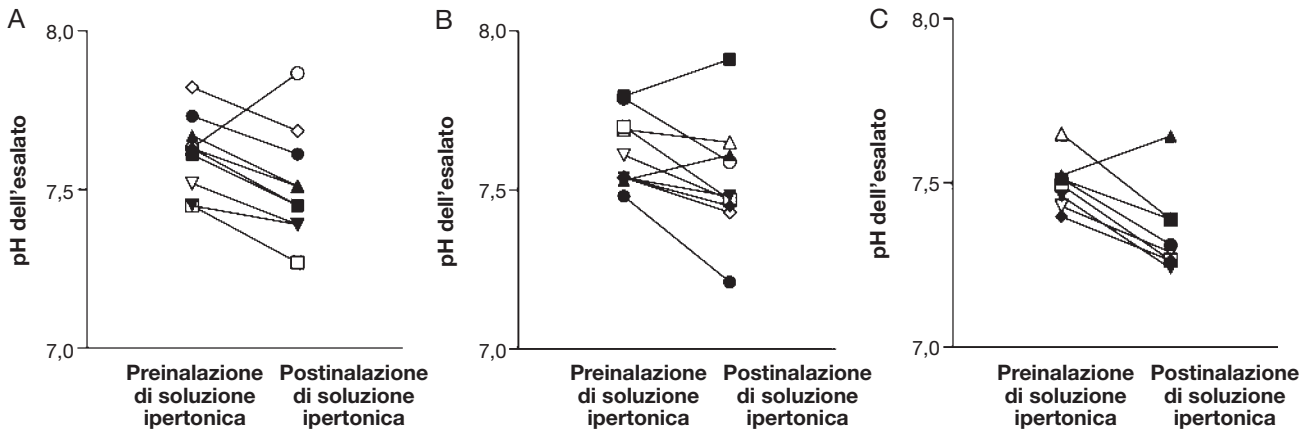


FIGURA 3. pH dell'esalato condensato di pazienti asmatici (A), BPCO (B) e soggetti sani (C) prima e dopo l'inalazione di una soluzione salina ipertonica.

pH esalato

Il pH è risultato misurabile nei campioni di esalato condensato di tutti i soggetti arruolati. Le concentrazioni di base del pH nell'esalato condensato erano significativamente più basse negli asmatici e nei pazienti con BPCO che nei soggetti sani ($p < 0,001$) [Figura 1].

Abbiamo osservato più basse concentrazioni del

pH dopo inalazione di soluzione salina ipertonica rispetto alle concentrazioni di base sia negli asmatici ($7,5 \pm 0,2$ vs $7,6 \pm 0,1$ pg/mL, $p < 0,05$) sia nei pazienti con BPCO ($7,5 \pm 0,1$ pg/mL vs $7,6 \pm 0,2$ pg/mL, $p < 0,05$), sia nei soggetti sani ($7,8 \pm 0,1$ pg/mL vs $7,9 \pm 0,1$ pg/mL, $p < 0,01$) [Figura 3]. Tuttavia, le concentrazioni del pH esalato non hanno mostrato alcun incremento dopo l'inalazione di una

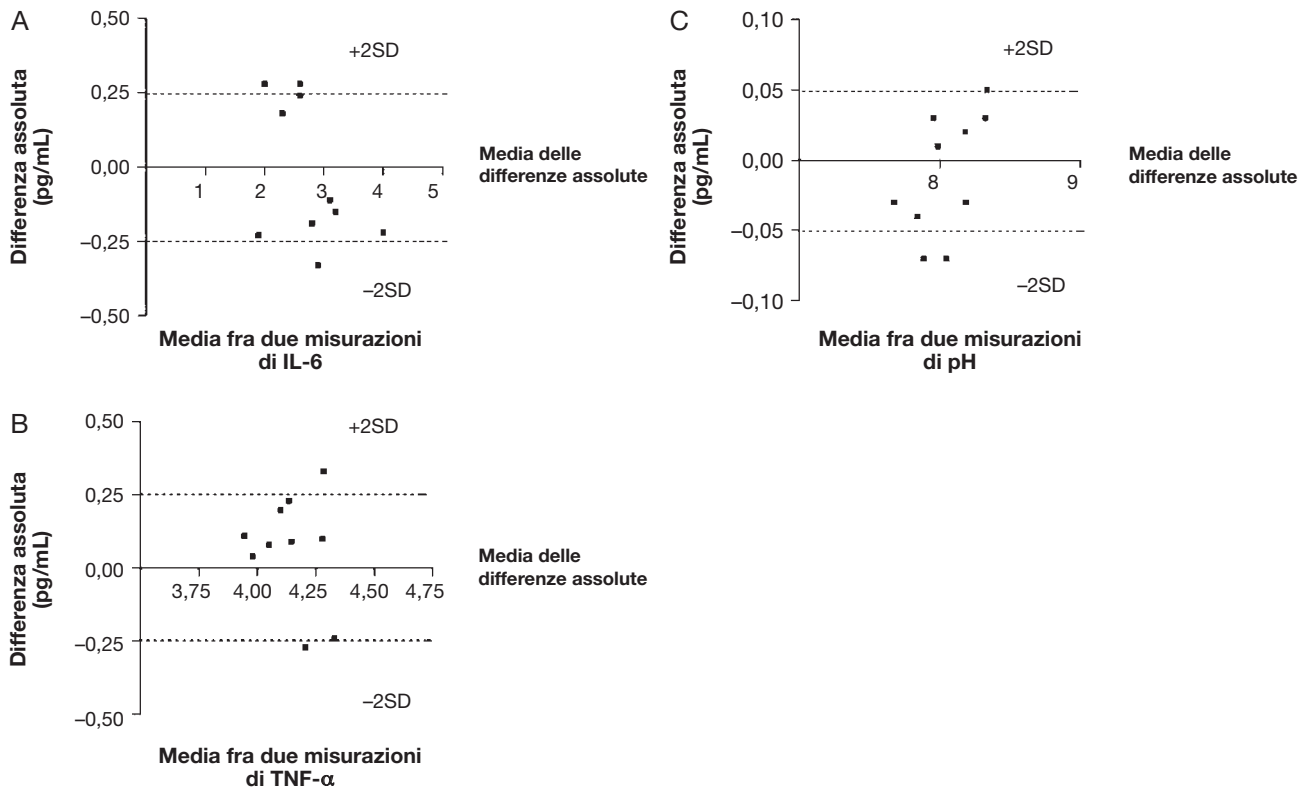


FIGURA 4. Grado di riproducibilità fra due successive misurazioni di concentrazioni di IL-6 (A), TNF- α (B) e pH (C) nell'esalato condensato di soggetti sani con il metodo di Bland-Altman.

soluzione salina isotonica ($7,6 \pm 0,1$ pg/mL vs $7,6 \pm 0,2$ pg/mL). Le modificazioni del pH dalle concentrazioni di base fra asmatici ($0,2 \pm 0,0$), BPCO ($0,1 \pm 0,0$) e soggetti sani ($0,2 \pm 0,0$) sono risultate non significative, con un intervallo di confidenza del 95%.

La riproducibilità delle misurazioni del pH nell'esalato condensato è stata testata in 10 soggetti sani non fumatori (6 maschi, età media 35 ± 7 anni) [Figura 4]. Nella maggioranza delle misurazioni, la differenza tra 2 valori di pH rimaneva tra ± 2 DS (differenza media $0,01 \pm 0,4$ pg/mL). Il coefficiente di variazione misurato per il TNF- α è stato di 0,4%.

DISCUSSIONE

Questo studio dimostra che l'inalazione di una soluzione salina ipertonica di per sè causa un'inflammatione di lieve entità nelle vie aeree. Le concentrazioni delle citochine infiammatorie sono risultate, infatti, dopo inalazione di soluzione salina ipertonica più alte rispetto a quelle di base in ogni gruppo di soggetti studiati. Inoltre, il pH è diventato più acido. Nessun cambiamento è stato invece osservato dopo inalazione di una soluzione salina isotonica.

Le concentrazioni di IL-6, TNF- α e del pH nell'esalato condensato sono risultate in correlazione fra di loro. Al contrario, nessuna differenza è stata osservata tra la conta cellulare totale e differenziale dopo l'inalazione di una soluzione ipertonica o isotonica.

Questo è il primo studio nel quale viene usato l'esalato condensato per valutare l'effetto dell'ipertonicità sull'inflammatione delle vie aeree. In confronto al BAL, questo campione biologico non è diluito. La procedura non influenza, inoltre, la funzionalità delle vie aeree nè causa inflammatione.^{16,17} Abbiamo deciso di valutare gli effetti infiammatori dell'inalazione di una soluzione salina ipertonica con l'EC dal momento che la non invasività della tecnica di raccolta di questo campione permette ripetute raccolte senza indurre inflammatione. Poiché in questo campione biologico c'è un numero insufficiente di cellule, abbiamo deciso di studiare l'inflammatione delle vie aeree misurando mediatori solubili come le citochine.

Abbiamo scelto di misurare due mediatori solubili, l'IL-6 e il TNF- α . L'IL-6 è un marker infiammatorio con note proprietà chemoattraenti per i neutrofili e di attivazione di queste cellule. Inoltre, possiede l'acacità di dirigere la risposta immunitaria T-helper di tipo 2.^{18,19} Il TNF- α è una citochina nota per la sua acacità di mediare e aumentare la reazione infiammatoria.²⁰ Queste citochine sono state precedentemente misurate da Purokivi e coll.²¹ che ne hanno dimostrato la riproducibilità, studiando gli effetti infiammatori dell'inalazione di una soluzione

salina nell'espettorato indotto ripetuto dopo 48 ore.

I nostri risultati sono in accordo con quelli dei precedenti studi^{22,23} sugli effetti della soluzione salina ipertonica sull'aumentata produzione di citochine infiammatorie *in vitro* e *in vivo*. Essi confermano il coinvolgimento dei neutrofili nell'inflammatione indotta dalla soluzione salina, come precedentemente descritto da Nightingale e coll.²⁴ In questo studio, abbiamo inoltre osservato un aumento delle concentrazioni delle citochine infiammatorie dello stesso grado dopo inalazione di soluzione ipertonica in ogni gruppo di pazienti arruolati. Questi risultati sono molto importanti dal momento che escludono altri stimoli infiammatori come causa della inflammatione delle vie aeree.

I dati sul pH esalato confermano quelli sulle citochine riguardo l'inflammatione indotta da una soluzione ipertonica. Un'acidificazione dell'esalato condensato è stata infatti trovata dopo induzione dell'espettorato con soluzione salina ipertonica ma non con soluzione salina isotonica in tutti i gruppi di soggetti studiati. La riduzione dei valori del pH dell'esalato come risultato di un'inflammatione delle vie aeree era già stato segnalato da Hunt e coll.²⁵ e verificato da una sua normalizzazione dopo trattamento antinfiammatorio. Le cellule infiammatorie principalmente coinvolte nell'acidificazione del pH sembrano essere i neutrofili.²⁶ I granuli di queste cellule contengono la mieloperossidasi che è rilasciata nelle vie aeree e catalizza la reazione tra perossido d'idrogeno e ioni cloruro a formare l'acido ipocloridico (HOCl).²⁷ Questo acido molto volatile sembra giocare un ruolo chiave nell'acidificazione dell'esalato condensato.²⁶

In accordo con precedenti risultati del nostro gruppo, abbiamo osservato una correlazione negativa tra pH esalato e gli altri marker infiammatori neutrofili (IL-6, TNF- α), che conferma la nostra precedente ipotesi che il pH dell'esalato è un marker di inflammatione neutrofila.⁷ Noi crediamo che la correlazione osservata tra IL-6, TNF- α e pH potrebbe suggerire che ognuno di questi marker sia correlato con l'intensità dell'inflammatione in atto.

Tuttavia, dati contrastanti sono riportati in letteratura sugli effetti dell'inalazione di una soluzione salina sull'inflammatione delle vie aeree.^{17,28,29} La discrepanza esistente tra i differenti studi molto probabilmente riflette differenze metodologiche e differenti popolazioni in studio. I soggetti con una preesistente inflammatione delle vie aeree possono nascondere l'effetto infiammatorio della soluzione salina ipertonica. Per ovviare a questo problema, abbiamo deciso di studiare tre gruppi di soggetti con differenti status infiammatori delle vie aeree: asmatici, pazienti con BPCO e soggetti sani. Per quanto riguarda l'ultimo gruppo, i dati disponibili sono molto limitati nonostante i controlli sani siano un target di studio parti-

colarmente utile, non presentando una preesistente infiammazione delle vie aeree.³⁰ L'aumento dell'IL-6 e del TNF- α nell'esalato condensato rispetto alle concentrazioni di base, che noi abbiamo osservato nei soggetti sani, rappresenta dunque un'importante evidenza che l'ipertonicità genera un'infiammazione delle vie aeree di lieve entità. In questo studio, un aumento nella preesistente infiammazione delle vie aeree è stato trovato nei soggetti asmatici e BPCO dopo inalazione di una soluzione salina ipertonica. Questi risultati suggeriscono che l'ipertonicità stessa possa anche agire aumentando ulteriormente l'infiammazione delle vie aeree di base nei soggetti affetti da malattie respiratorie.

In questo studio, abbiamo confermato che l'ipertonicità stessa è responsabile dell'infiammazione delle vie aeree dal momento che le citochine infiammatorie non hanno mostrato alcun aumento dopo induzione dell'espettorato con soluzione salina isotonica. Questi risultati suggeriscono che l'infiammazione delle vie aeree osservata dopo inalazione di una soluzione ipertonica non è secondaria allo stimolo meccanico causato dall'induzione dell'espettorazione ma dall'ipertonicità. La nostra supposizione è confermata da Beier e coll.³¹ che hanno mostrato una riduzione dell'ossido nitrico dopo soluzione salina ipertonica ma non dopo una soluzione salina isotonica.

Molte ipotesi sono state fatte per spiegare il meccanismo dell'infiammazione indotta da soluzione salina ipertonica. La teoria più importante ipotizza un aumento della permeabilità vascolare attraverso il rilascio di neuropeptidi dai nervi sensoriali. Questa permeabilità vascolare è stata dimostrata, al momento, solo nei ratti.⁴

Abbiamo analizzato l'effetto della ipertonicità dopo 15 minuti di inalazione della soluzione salina. L'aumento nei marker infiammatori a questo "time point" potrebbe essere transitorio e non avere significato clinico. Questi risultati, pertanto, necessitano di essere confermati dopo un periodo più lungo.

In questo studio, abbiamo anche ricercato l'effetto dell'ipertonicità sulla conta cellulare differenziale nell'espettorato indotto di un piccolo gruppo di soggetti sani arruolati, dopo l'inalazione di una soluzione salina ipertonica e 7 giorni dopo l'inalazione di una soluzione salina isotonica. Abbiamo eseguito le due induzioni a 7 giorni di intervallo l'una dall'altra per evitare l'influenza della prima induzione sulla composizione cellulare del secondo campione di espettorato, come precedentemente riportato.³²

In accordo con precedenti studi, non abbiamo trovato alcuna differenza rispetto alla conta cellulare totale e differenziale tra i due metodi di induzione dell'espettorato. Questi risultati indicano che l'inalazione di una soluzione salina ipertonica di *per sé* potrebbe indurre il rilascio di mediatori della flogosi

nelle vie aeree ma non induce cambiamenti nelle cellule infiammatorie.³²⁻³³

In conclusione, i nostri risultati, forniscono evidenze che l'inalazione di una soluzione salina ipertonica causa un'infiammazione lieve delle vie aeree che potrebbe essere dimostrata attraverso il dosaggio delle concentrazioni di marker infiammatori, come l'IL-6, il TNF- α e il pH, nell'esalato condensato. Questo studio conferma ulteriormente l'utilità dell'analisi dell'esalato condensato come metodica non-invasiva e ripetibile di monitoraggio dell'infiammazione delle vie aeree.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, et al. Induced sputum cellularity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1172-1174
- 2 Louis R, Bettiol J, Cataldo D, et al. Value of induced sputum in the investigation of asthma. *Rev Mal Respir* 2003; 20:215-223
- 3 Fireman E. Induced sputum as a diagnostic tactic in pulmonary diseases. *Isr Med Assoc J* 2003; 5:524-527
- 4 Umeno E, McDonald DM, Nadel JA. Hypertonic saline increases vascular permeability in the rat trachea by producing neurogenic inflammation. *J Clin Invest* 1990; 85:1905-1908
- 5 Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, et al. IL-6 is increased in breath condensate of smokers. *Eur Respir J* 2003; 21:589-593
- 6 Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, et al. Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1109-1112
- 7 Carpagnano GE, Barnes PJ, Francis J, et al. Breath condensate pH in children with CF and asthma: a new non-invasive marker of airway inflammation? *Chest* 2004; 125:2005-2010
- 8 Shashid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, et al. Increased interleukin 4 and decreased interferon gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1290-1293
- 9 National Heart, Lung, and Blood Institute. Global strategy for asthma management and prevention. Global Initiative for Asthma. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 1995; Publication No. 95-3659
- 10 Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1256-1276
- 11 Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, et al. Induced sputum cellularity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1172-1174
- 12 Dreborg S, Frew A. Position paper: allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993; 48(suppl 14):49-82
- 13 Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, et al. Airway responsiveness: standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Respir J* 1993; 6(suppl 16):53-83
- 14 Bland JM, Altman DG. Statistics notes: measurement error. *BMJ* 1996; 313:744
- 15 Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, et al. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1364-1370

- 16 Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, et al. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest* 2002; 122:1162–1167
- 17 Suri R, Marshall LJ, Wallis C, et al. Safety and use of sputum induction in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2003; 35:309–313
- 18 Heijink IH, Vellenga E, Borger P, et al. Interleukin-6 promotes the production of interleukin-4 and interleukin-5 by interleukin-2-dependent and -independent mechanisms in freshly isolated human T cells. *Immunology* 2002; 107:316–324
- 19 Woodruff PG, Khashayar R, Fahji V. Relationship between inflammation, hyperresponsiveness and obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108:753–758
- 20 Alho HS, Maasilta PK, Harjula AL, et al. Tumor necrosis factor-alpha in a porcine bronchial model of obliterative bronchiolitis. *Transplantation* 2003; 15:516–523
- 21 Purokivi M, Randell J, Hirvonen MR, et al. Reproducibility of measurements of exhaled NO, and cell count and cytokine concentrations in induced sputum. *Eur Respir J* 2000; 16: 242–246
- 22 Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, et al. Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:634–640
- 23 Tabary O, Escotte S, Couetil JP, et al. High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I κ B kinase α pathway in response to extracellular NaCl content. *J Immunol* 2000; 164:3377–3384
- 24 Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax* 1998; 53:87–90
- 25 Hunt JF, Fang K, Malik R, et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 216–226
- 26 Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, et al. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1364–1370
- 27 Repine JE, Bast A, Lankhorst I, and the Oxidative Stress Study Group. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:341–357
- 28 Bacci E, Cianchetti S, Paggiaro PL, et al. Comparison between hypertonic and isotonic saline-induced sputum in the evaluation of airway inflammation in subjects with moderate asthma. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:1395–1400
- 29 Bhowmik A, Seemungal TAR, Sapsford RJ, et al. Comparison of spontaneous and induced sputum for investigation of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1998; 53:953–956
- 30 Nordenha C, Pourazar J, Blomberg A, et al. Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J* 2000; 15:1046–1105
- 31 Beier J, Beeh KM, Kornmann O, et al. Sputum induction leads to a decrease of exhaled nitric oxide unrelated to airflow. *Eur Respir J* 2003; 22:354–357
- 32 Cataldo D, Foidart JM, Lau L, et al. Induced sputum comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma. *Chest* 2001; 120:1815–1821
- 33 Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. *Eur Respir J* 1995; 8:559–565