

Elevato stress ossidativo e riduzione inversamente proporzionale dei livelli di vascular endothelial growth factor rispetto al grado di gravità della BPCO*

Hiroshi Kanazawa, MD, PhD; Junichi Yoshikawa, MD, PhD

Obiettivi dello studio: L'ipotesi prevalente riguardo la patogenesi della BPCO è che alla base di questa patologia vi sia un'alterazione del normale equilibrio tra ossidanti e antiossidanti. Tuttavia, è stato anche riportato che una riduzione del vascular endothelial growth factor (VEGF) potrebbe influenzare la patogenesi della BPCO. Pertanto, questo studio è stato progettato per valutare le differenze tra i livelli di stress ossidativo e di VEGF e il grado di gravità della BPCO.

Disegno dello studio: Analisi controllata incrociata.

Sede dello studio: Clinica universitaria.

Partecipanti: Sono stati inclusi nello studio dodici soggetti sani di controllo e 57 pazienti con BPCO. I pazienti con BPCO sono stati divisi in quattro gruppi sulla base della classificazione della Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (BPCO lieve, 14 pazienti; BPCO moderata, 15 pazienti; BPCO severa, 16 pazienti; BPCO molto severa, 12 pazienti).

Misurazioni e risultati: In tutti i soggetti studiati sono stati esaminati i marker infiammatori, il grado di stress ossidativo e i livelli di VEGF nell'espettorato. Nei pazienti con BPCO i livelli di ossido nitrico erano significativamente più alti rispetto ai soggetti di controllo, e aumentavano con il peggiorare della gravità della BPCO. In contrasto, l'attività inibitrice della perossinitrite diminuiva con l'aumentare della gravità della BPCO. Pertanto, lo stress perossinitritico medio (DS) (ossia, il rapporto tra il livello di ossido nitrico/attività inibitrice perossinitritica aumentava rapidamente con l'aumentare della gravità della BPCO in confronto con quello dei soggetti sani di controllo (BPCO lieve: 8,4; DS, 1,5; $p = 0,02$; BPCO moderata: 10,8; DS, 1,4; $p < 0,0001$; BPCO severa: 14,5; DS, 2,5; $p < 0,0001$; BPCO molto severa: 18,3; DS, 4,1; $p < 0,0001$). I livelli di VEGF nell'espettorato indotto si riducevano in maniera inversamente proporzionale rispetto al grado di gravità della BPCO (BPCO lieve: 1360 pg/mL; DS, 800 pg/mL; $p = 0,97$; BPCO moderata: 1180 pg/mL; DS, 760 pg/mL; $p = 0,50$; BPCO severa: 650 pg/mL; DS, 450 pg/mL; $p = 0,007$; BPCO molto severa: 480 pg/mL, DS, 240 pg/mL; $p = 0,002$). Inoltre l'attività inibitrice della perossinitrite nei pazienti con BPCO presentava una riduzione accelerata rispetto ai livelli medi di VEGF osservati nei soggetti sani di controllo.

Conclusioni: Livelli elevati di stress ossidativo e una riduzione inversa dei livelli di VEGF nell'espettorato indotto caratterizzavano l'aumento del grado di gravità della BPCO. Pertanto, il danno delle cellule epiteliali mediato dallo stress ossidativo potrebbe indurre una riduzione dei livelli di VEGF polmonare, determinando la progressione della BPCO.

(CHEST Edizione Italiana 2005; 4:39-45)

Parole chiave: BPCO; interleuchina-8; ossido nitrico; perossinitrite; vascular endothelial growth factor

Abbreviazioni: IL = interleuchina; NO = ossido nitrico; VEGF = vascular endothelial growth factor

La BPCO è uno dei maggiori problemi di salute pubblica nel mondo e la sua prevalenza e mortalità sono in aumento. Un aumentato stress ossidativo, che può essere definito come un'aumentata

esposizione ad agenti ossidanti e una diminuita capacità antiossidante, è stato riconosciuto ampiamente come una delle caratteristiche fondamentali della BPCO.¹ Gli agenti ossidanti endogeni sono

*Dal Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Japan.

Il lavoro è stato finanziato da una sovvenzione per la ricerca scientifica (n. 15590820 e n. 16590758) della Japan Society for the Promotion of Science.

Manoscritto ricevuto il 17 gennaio 2005; revisione accettata l'11 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: Hiroshi Kanazawa, MD, PhD, Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka City University, 1-4-3, Asahi-machi, Abenoku, Osaka, 545-8585, Japan; e-mail address: kanazawa-h@med.osaka-cu.ac.jp

(CHEST 2005; 128:3191-3197)

prodotti dalla reazione dei radicali liberi locali e le specie reattive dell'ossigeno intracellulari, e spesso determinano un esteso danno cellulare. Pertanto, la formazione di ossidanti a livello dell'epitelio polmonare e delle cellule infiammatorie gioca un ruolo chiave nella patogenesi della BPCO. È stato descritto un significativo aumento dell'espressione dell'enzima inducibile sintetasi dell'ossido nitrico (NO) nei neutrofili e nei macrofagi dei pazienti con BPCO, il che indica un'iperproduzione di NO in tali pazienti.² Infatti, studi precedenti^{3,4} hanno dimostrato che i livelli di NO nell'esalato e nell'espettorato indotto di soggetti con BPCO erano più elevati rispetto ai soggetti sani di controllo. Inoltre, nei polmoni dei pazienti con BPCO è presente un aumentato numero di neutrofili che producono un'elevata quantità di anione superossido.⁵ Pertanto, una contemporanea aumentata produzione di anione superossido e di NO potrebbe essere presente nei pazienti con BPCO e ciò determinerebbe un'iperproduzione di perossinitrite. Uno studio precedente⁶ ha dimostrato che la velocità media di formazione di perossinitrite potrebbe essere pari a 0,8 $\mu\text{mol/L/min}$ all'interno dell'intero polmone e a 1 mmol/L/min a livello del liquido che ricopre lo strato epiteliale. La maggior parte degli effetti citotossici che derivano dagli elevati livelli di NO sono mediati dalla perossinitrite.⁷ Una sovrapproduzione di perossinitrite, un agente ossidante estremamente potente, causa danno ossidativo a proteine, lipidi, DNA e carboidrati.⁸ Una delle maggiori modificazioni a livello delle proteine indotta dalla perossinitrite è la nitratura dei residui di tirosina su un gran numero di specie proteiche con la formazione del prodotto stabile 3-nitrotirosina che potrebbe determinare una modificazione della struttura della proteina e della funzione enzimatica.⁹ Così, l'esposizione alla perossinitrite potrebbe determinare il danno o la morte delle cellule epiteliali, danneggiare direttamente i tessuti polmonari e, possibilmente, favorire lo sviluppo della BPCO. Sebbene tale agente ossidante sia altamente reattivo, la sua moderata velocità di decomposizione in condizioni fisiologiche permette alla perossinitrite di diffondere attraverso numerose cellule e raggiungere così differenti cellule bersaglio prima di essere protonata e in parte, circa il 30%, decomporre con formazione di diossido di azoto e specie radicali idrossilate, mentre la restante parte di perossinitrite isomerizza in nitrati. Inoltre, il tempo di dimezzamento della perossinitrite è stato riportato¹⁰ essere di solo 1 secondo a pH di 7,4 e temperatura di 37 °C. Dall'altro lato, noi abbiamo osservato che l'attività inibitrice della perossinitrite nell'espettorato indotto di pazienti con BPCO risulta essere ridotta.¹¹ Questi dati suggeriscono un ruolo importante per lo stress derivato da aumentati livelli di perossinitrite nella patogenesi della BPCO.

Tuttavia, un'ipotesi alternativa riguardante la patogenesi della BPCO è stata recentemente proposta

basandosi sui risultati di un recente studio, in cui è stata descritta una progressiva perdita delle strutture alveolari mediata da apoptosi delle cellule epiteliali ed endoteliali. Il vascular endothelial growth factor (VEGF) induce la proliferazione delle cellule endoteliali e la privazione di VEGF determina l'apoptosi delle cellule endoteliali.¹³ Pertanto, il VEGF è un fattore trofico necessario per la sopravvivenza delle cellule endoteliali. Infatti, studi precedenti^{14,15} hanno anche riportato che i livelli di proteina e l'espressione di RNA messaggero di VEGF e del suo recettore sono ridotti nei tessuti polmonari provenienti da pazienti con BPCO, e che la riduzione del VEGF potrebbe svolgere un ruolo nella patogenesi della BPCO. Tuttavia, non è noto se tale riduzione a livello delle cellule endoteliali polmonari determini una conseguente perdita di cellule epiteliali polmonari. Se il VEGF è un fattore critico per il mantenimento del compartimento alveolare, e nei pazienti con BPCO vi è una riduzione di tale compartimento, ci si potrebbe aspettare che i livelli di VEGF siano ridotti, poiché in tali pazienti ci sono meno setti alveolari che richiedono l'attività del VEGF. Pertanto, non è ancora del tutto chiaro se la riduzione della produzione del VEGF rappresenti una causa o una conseguenza della BPCO. Inoltre, uno studio precedente¹⁶ suggerisce che il VEGF sia prodotto soprattutto dalle cellule epiteliali polmonari, e che la riduzione dei livelli di VEGF sia da mettere in relazione all'esteso danno epiteliale. Pertanto, questo studio è stato progettato per valutare l'elevato stress ossidativo a livello delle cellule epiteliali e la conseguente riduzione a livello polmonare dei livelli di VEGF con l'aumentare del grado di gravità della BPCO.

MATERIALI E METODI

Soggetti

Dodici soggetti sani di controllo, non fumatori, con nessuna malattia polmonare all'anamnesi sono stati reclutati nello studio. Inoltre sono stati reclutati cinquantasette pazienti con BPCO, la cui diagnosi ed il grado di gravità della malattia venivano stabiliti in base ai criteri emessi dalla "Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases".¹⁷ I pazienti con BPCO sono stati arruolati in maniera casuale da parte degli ambulatori del nostro istituto. I pazienti sono stati poi suddivisi in quattro gruppi in base alla classificazione di gravità della BPCO adottata dalla "Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases" (BPCO lieve, caratterizzata da una lieve limitazione del flusso aereo [$\text{FEV}_1/\text{FVC} < 70\%$ del predetto ma $> 80\%$ del predetto]); BPCO moderata, caratterizzata da un peggioramento della limitazione del flusso aereo [$\text{FEV}_1 > 50\%$ del predetto ma $\leq 80\%$ del predetto]); BPCO severa, caratterizzata da un ulteriore peggioramento della limitazione del flusso aereo [$\text{FEV}_1 > 30\%$ del predetto ma $< 50\%$ del predetto]); BPCO molto severa, caratterizzata da una severa limitazione del flusso aereo [$\text{FEV}_1 < 30\%$ del predetto] o dalla presenza di un'insufficienza respiratoria cronica [$\text{PaO}_2 < 60 \text{ mm Hg}$]. Tutti i pazienti con BPCO avevano un'anamnesi positiva per fumo di sigaretta (> 20 pacchetti/anno) ed

una limitazione del flusso aereo di tipo irreversibile (reversibilità < 10% del FEV₁ predetto dopo inalazione di 200 µg di salbutamolo). La loro terapia usuale consisteva in teofillina e farmaci anticolinergici per via inalatoria, ma nessuno riceveva corticosteroidi per via inalatoria o orale. Tutti i pazienti erano clinicamente stabili e nessuno aveva in anamnesi infezioni respiratorie nelle ultime 4 settimane precedenti lo studio. Nessun soggetto reclutato in questo studio aveva in passato partecipato ad altri studi e, pertanto, non esisteva pericolo di sovrapposizione dei dati provenienti da questo studio con quelli provenienti da altri. Tutti i soggetti hanno fornito il loro consenso informato scritto per partecipare allo studio, che è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Osaka.

Induzione dell'espettorato e suo processamento

La spirometria veniva eseguita dopo inalazione di 200 µg di salbutamolo spray. Tutti i soggetti venivano poi istruiti a sciacquare accuratamente la bocca con acqua. Inalavano poi una soluzione salina al 3% a temperatura ambiente che veniva nebulizzata attraverso un nebulizzatore ultrasonico (NE-U12; Omron Co; Tokyo, Giappone) alla massima gettata. I pazienti erano incoraggiati a tossire profondamente dopo un intervallo di 3 minuti. I campioni di espettorato indotto, che venivano diluiti in soluzione salina tampone-fosfato (PBS) contenente ditiotreitolo (concentrazione finale, 1 nm/L) venivano poi centrifugati a 400 g per 10 minuti e le cellule poi risospese. I vetrini venivano preparati usando una citocentrifuga e venivano colorati con May-Grunwald-Giemsa per la conta cellulare differenziata. I risultati della conta cellulare differenziata dei campioni di espettorato indotto rappresentavano la media della conta eseguita da almeno tre pneumologi in tempi diversi in cieco. Tutti gli esaminatori contavano almeno 500 cellule non squamose. Dalle percentuali delle conte differenziali eseguite dai singoli esaminatori venivano poi calcolate le medie per ottenere il risultato finale. Il supernatante veniva conservato a -70°C per le successive analisi per la determinazione dei livelli di interleuchina (IL)-8, VEGF e NO. Le concentrazioni di IL-8 e VEGF sono state misurate utilizzando un sistema immuno-enzimatico (Amersham, UK, e R&D System, MN, rispettivamente). I livelli di NO (sia nitriti che nitrati) nell'espettorato indotto venivano analizzati colorimetricamente dopo la reazione di Griess come descritto precedentemente.¹⁸ Duecento microlitri del campione di espettorato o soluzione standard PBS venivano deproteinati aggiungendo 20 µL di NaOH (1,0 mol/L, 4°C; Wako Chemical Co; Osaka Giappone) e 30 µL di ZnSO₄ (1,3 mol/L, 4°C; Wako Chemical Co; Osaka, Giappone). I campioni venivano agitati e lasciati a giacere in ghiaccio per 15 minuti. Dopo la centrifugazione (5 minuti, 4°C, 2600 g), 100 µL di supernatante venivano aggiunti a 0,05 U di nitrato-reduttasi (Sigma Chemical Co; St Louis, MO), 20 µL di 0,2 mol/L N-tris (idrossimetil) metilamino acido entanosulfonico (pH 7,0 Sigma Chemical Co) e 20 µL di 0,5 mol/L formato di sodio (Wako Chemical Co). Dopo un'incubazione in condizioni anaerobiche a temperatura ambiente per 20 minuti, veniva aggiunto 1,0 mL di acqua ai campioni, e i nitrati venivano analiz-

zati nei supernatanti ottenuti dalla centrifugazione (5 minuti a 260 g). I campioni deproteinati e gli standard (200 µL) venivano mescolati con 20 µL di una soluzione 1% sulfanilamide (Sigma Chemical Co) in acido fosforico al 15% (Wako Chemical Co). Dopo 10 minuti venivano aggiunti 20 mL di 0,1% N-(1-naftil) etilendiamina (Sigma Chemical Co) e veniva determinato l'assorbimento a 540 nm. Tutti i soggetti hanno prodotto un adeguato campione di espettorato; un campione veniva considerato adeguato se il paziente era capace di espettorare almeno 2 mL di espettorato e se nel citocentrifugato alla conta cellulare differenziale le cellule squamose erano meno del 10% delle totali.

Misurazione dell'attività inibitrice della perossinitrite

Abbiamo utilizzato la fase sol della componente solubile dell'espettorato per la misurazione dell'attività inibitrice della perossinitrite per evitare un eventuale potenziale effetto confondente del ditiotreitolo, così come descritto in un nostro precedente studio.¹⁹ La fase sol veniva ottenuta tramite la ultracentrifugazione della rimanente porzione del campione di espettorato a 60.000 g per 60 minuti. La porzione rimanente veniva separata e conservata a -70°C per successive valutazioni dell'attività inibitrice perossinitritica. Le soluzioni di lavoro di perossinitrite (Wako Chemical Co) venivano preparate a partire da una soluzione di NaOH 0,1 N subito prima del loro utilizzo raggiungendo una soluzione pari a 10⁻² mol/L, e ulteriori successive diluizioni venivano eseguite utilizzando PBS. La concentrazione di perossinitrite veniva determinata spettrofotometricamente tramite la misurazione dell'assorbimento a 302 nm (εM = 1670 mmol/L/cm). La perossinitrite ossida rapidamente la diidrorodamina 123.²⁰ Veniva costruita una curva standard dell'attività ossidante della diidrorodamina 123 verso la rodamina utilizzando la perossinitrite. L'attività inibitrice della perossinitrite veniva valutata monitorandola formazione di rodamina a 500 nm nel corso di reazioni cui si aggiungevano 200 µL di campione di espettorato, 1,3 mL di diidrorodamina 123 diluita con PBS (pH 7,4) e 500 µL di perossinitrite per 30 minuti a temperatura ambiente. L'attività inibitrice perossinitritica veniva valutata almeno in triplicato, e i nostri dati²¹ hanno supportato la specificità di questo sistema di analisi della perossinitrite. La riproducibilità delle nostre valutazioni in questo studio è stata confermata da misurazioni ripetute eseguite negli stessi soggetti in giorni diversi.

Analisi statistica

Tutti i valori sono presentati come media (DS). Le comparazioni multiple tra i gruppi sono state analizzate tramite l'analisi della varianza a una via seguita dalla correzione di Bonferroni. La significatività delle correlazioni veniva valutata tramite la determinazione dei coefficienti di correlazione di Spearman. La correlazione tra i livelli di VEGF e l'attività inibitrice della perossinitrite nell'espettorato indotto veniva calcolata tramite la regressione lineare utilizzando il metodo dei minimi quadrati. Un valore di p < 0,05 veniva considerato significativo.

Tabella 1—Caratteristiche cliniche dei soggetti dello studio*

Caratteristiche	Soggetti sani di controllo (n = 12)	Pazienti con BPCO			
		Lieve (n = 14)	Moderata (n = 15)	Severa (n = 16)	Molto severa (n = 12)
Età	57,8 (4,0)	60,7 (4,3)	61,7 (4,9)	63,1 (5,0)	65,8 (6,2)
Fumo, pacchetti/anno	0	34,1 (6,7)	32,8 (7,1)	33,1 (7,6)	34,5 (6,4)
FEV ₁ % del predetto	96,6 (5,0)	87,7 (5,1)	68,1 (8,6)	39,4 (6,7)	36,5 (4,9)
FEV ₁ /FVC	85,6 (2,1)	65,7 (3,4)	59,2 (5,3)	40,9 (7,5)	35,3 (4,6)
PaO ₂ mmHg	ND	83,4 (6,4)	75,1 (6,3)	69,1 (6,3)	54,8 (2,9)

*I valori sono espressi come media (DS). ND = non determinato.

RISULTATI

Le caratteristiche cliniche dei 57 pazienti con BPCO e dei 12 soggetti sani di controllo sono riassunte nella Tabella 1. Tutti i pazienti con BPCO avevano un significativo deficit ventilatorio ostruttivo (rapporto FEV₁/FVC post broncodilatatore < 70% del predetto). La percentuale dei neutrofili e la concentrazione dell'IL-8 nell'espettorato indotto erano significativamente maggiori nei pazienti con BPCO (BPCO lieve: neutrofili, 47,1% [DS, 5,5%], $p = 0,027$; IL-8, 3,3 ng/mL [DS 0,8 ng/mL], $p = 0,018$; BPCO moderata: neutrofili, 49,2% [DS, 7,7%], $p = 0,003$; IL-8, 4,0 ng/mL [DS 1,3 ng/mL], $p = 0,002$; BPCO severa: neutrofili, 56,4% [DS, 8,5%], $p < 0,0001$; IL-8, 6,9 ng/mL [DS 3,0 ng/mL], $p < 0,0001$; BPCO molto severa: neutrofili, 62,8% [DS, 8,6%], $p < 0,0001$; IL-8, 9,8 ng/mL [DS 4,1 ng/mL], $p < 0,0001$) rispetto ai soggetti sani di controllo (neutrofili, 40,1% [DS, 4,1%]; IL-8, 1,0 ng/mL [DS 0,5 ng/mL]) [Figura 1]. Inoltre, la percentuale dei neutrofili era significativamente correlata con i livelli di IL-8 nell'espettorato indotto nei pazienti con BPCO ($r = 0,87$; $p < 0,0001$). Abbiamo anche osservato che nei pazienti con BPCO il rapporto FEV₁/FVC era inversamente correlato con la percentuale di neutrofili ($r = -0,54$; $p < 0,0001$) e con i livelli di IL-8 ($r = -0,71$; $p < 0,0001$).

I livelli di NO nell'espettorato indotto erano significativamente più alti nei pazienti con BPCO (BPCO lieve: 700 $\mu\text{mol/L}$ [DS, 120 $\mu\text{mol/L}$], $p = 0,0003$; BPCO moderata: 800 $\mu\text{mol/L}$ [DS, 110 $\mu\text{mol/L}$], $p < 0,0001$; BPCO severa: 910 $\mu\text{mol/L}$ [DS, 110 $\mu\text{mol/L}$], $p < 0,0001$; BPCO molto severa: 980 $\mu\text{mol/L}$ [DS, 120 $\mu\text{mol/L}$], $p < 0,0001$) rispetto ai soggetti

sani di controllo (540 $\mu\text{mol/L}$ [DS, 80 $\mu\text{mol/L}$]) [Figura 2, sinistra A]. Nei pazienti con BPCO questi livelli erano significativamente correlati sia con la percentuale di neutrofili ($r = 0,72$; $p < 0,0001$) sia con i livelli di IL-8 ($r = 0,72$; $p < 0,0001$). In contrasto, nei pazienti con BPCO l'attività inibitrice della perossinitrite nell'espettorato indotto era significativamente minore (BPCO lieve: 83,1% [DS, 6,5%], $p = 0,32$; BPCO moderata: 73,8% [DS, 6,3%], $p < 0,0001$; BPCO severa: 63,4% [DS, 7,1%], $p < 0,0001$; BPCO molto severa: 55,1% [DS, 8,5%], $p < 0,0001$) rispetto ai soggetti sani di controllo (86,0% [DS, 7,6%]) [Figura 2, destra B]. Pertanto, lo stress perossinitritico (per es. il rapporto livelli di NO/attività inibitrice della perossinitrite) era significativamente maggiore in tutti e quattro i gruppi dei pazienti con BPCO (BPCO lieve: 8,4 [DS, 1,5], $p = 0,023$; BPCO moderata: 10,8 [DS, 1,4], $p < 0,0001$; BPCO severa: 14,5 [DS, 2,5], $p < 0,0001$; BPCO molto severa: 18,3 [DS, 4,1], $p < 0,0001$) rispetto ai soggetti sani di controllo (6,3 [DS, 1,0]). Lo stress perossinitritico era inversamente correlato sia con la percentuale del FEV₁ rispetto al predetto ($r = 0,82$; $p < 0,0001$) sia col rapporto FEV₁/FVC ($r = -0,81$; $p < 0,0001$) nei pazienti con BPCO.

I livelli di VEGF nell'espettorato indotto diminuivano con l'aumentare del grado di gravità della BPCO (BPCO lieve: 1360 pg/mL [DS, 800 pg/mL]; BPCO moderata: 1180 pg/mL [DS, 760 pg/mL]; BPCO severa: 650 pg/mL [DS, 450 pg/mL]; BPCO molto severa: 480 pg/mL [DS, 240 pg/mL];) [Figura 3]. Tuttavia i livelli di VEGF erano significativamente ridotti solo nei pazienti con BPCO severa ($p = 0,007$) o molto severa ($p = 0,002$) rispetto ai soggetti

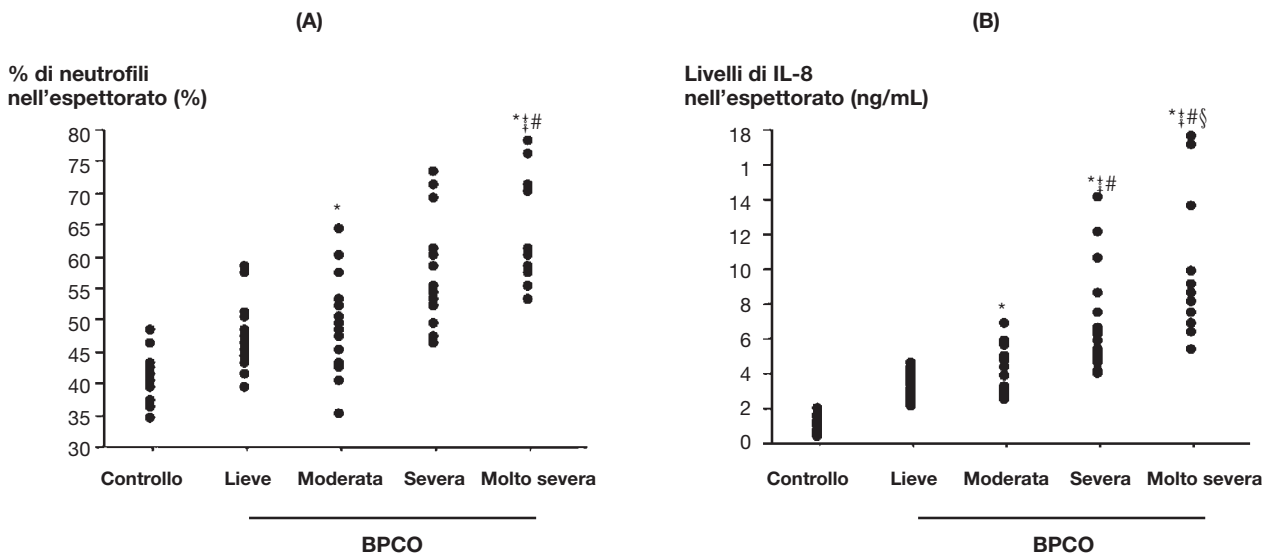


FIGURA 1. Percentuale di neutrofili (a sinistra, A) e livelli di IL-8 (a destra, B) nell'espettorato indotto nei soggetti sani di controllo e nei pazienti con BPCO. * = $p < 0,01$ vs soggetti sani di controllo; † = $p < 0,01$ vs pazienti con BPCO lieve; # = $p < 0,01$ vs pazienti con BPCO moderata; § = $p < 0,01$ vs pazienti con BPCO severa.

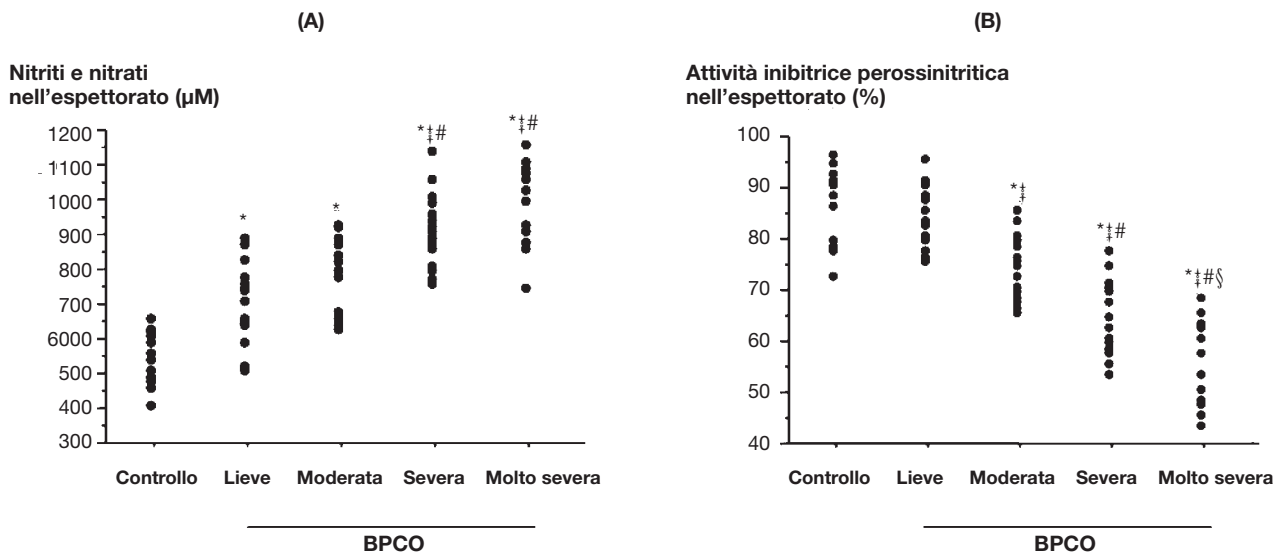


FIGURA 2. Livelli di NO (a sinistra, A) e attività inibitrice perossinitrica (a destra, B) nell'espettorato indotto nei soggetti sani di controllo e nei pazienti con BPCO. * = $p < 0,01$ vs soggetti sani di controllo; ‡ = $p < 0,01$ vs pazienti con BPCO lieve; # = $p < 0,01$ vs pazienti con BPCO moderata; § = $p < 0,01$ vs pazienti con BPCO severa.

sani di controllo (1350 pg/mL [DS, 840 pg/mL]). Abbiamo anche esaminato la correlazione tra attività inibitrice perossinitrica e livelli di VEGF nei pazienti con BPCO. L'attività inibitrice perossinitrica nei pazienti con BPCO presentava una rapida riduzione a partire dai livelli di VEGF intorno ai 1350 pg/mL, valore che rappresenta la media dei livelli di VEGF nei soggetti sani di controllo.

DISCUSSIONE

L'aspetto nuovo di questo studio è rappresentato dall'aver riscontrato un'aumentata esposizione a NO anche nei pazienti con BPCO di grado lieve. Infatti,

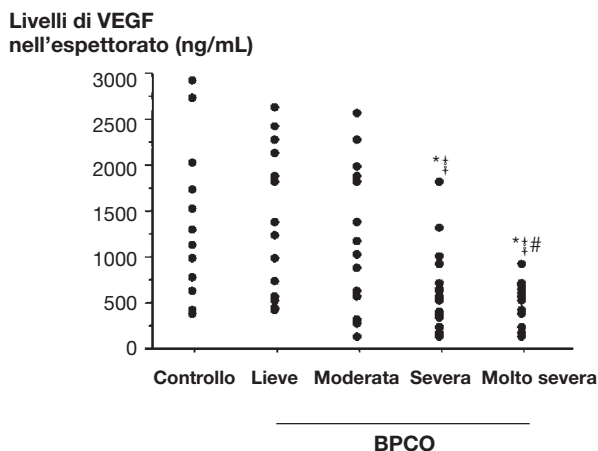


FIGURA 3. Livelli di VEGF nell'espettorato indotto in soggetti sani di controllo e in pazienti con BPCO. * = $p < 0,01$ vs soggetti sani di controllo; ‡ = $p < 0,01$ vs pazienti con BPCO lieve; # = $p < 0,01$ vs pazienti con BPCO moderata.

in questi pazienti la percentuale di neutrofili e i livelli di IL-8 nell'espettorato indotto erano significativamente più alti rispetto ai soggetti di controllo. L'IL-8 è una citochina che viene sintetizzata da una varietà di cellule infiammatorie a livello polmonare ed è un potente attivatore dei neutrofili.²² L'IL-8 induce il rilascio di anione superossido da parte dei granulociti neutrofili *in vitro* ed è stato dimostrato che la somministrazione endovenosa di IL-8 è in grado di indurre l'accumulo di neutrofili a livello polmonare. Pertanto, l'espressione di IL-8 potrebbe essere di grande importanza nella patogenesi della BPCO. In questo studio abbiamo osservato che i livelli di IL-8 aumentano col progredire del grado di gravità della BPCO, e questi livelli sono associati al grado di ostruzione bronchiale nei pazienti con

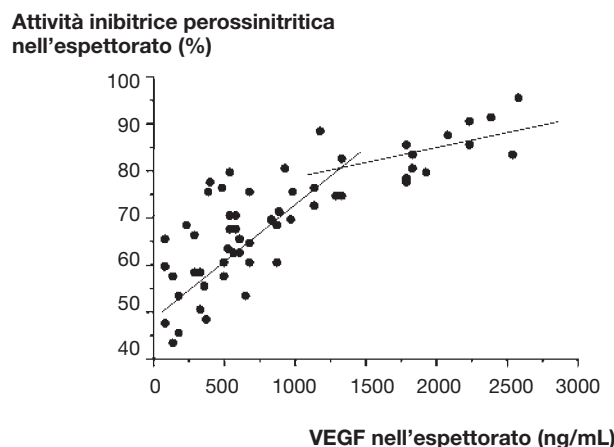


FIGURA 4. Correlazione tra attività inibitrice perossinitrica e livelli di VEGF nell'espettorato indotto di pazienti con BPCO.

BPCO. Le attuali teorie prevalenti sulla patogenesi della BPCO hanno focalizzato la loro attenzione sulla produzione di ossidanti da parte dei neutrofili stimolati con IL-8. Infatti, anche in questo studio è stato osservato che l'infiammazione neutrofila era associata con una aumentata produzione di NO nei pazienti con BPCO.

Lo stato di infiammazione delle vie aeree sembra svolgere un ruolo importante nella patogenesi della BPCO,²³ ed è stato dimostrato che la produzione di anioni superossido e NO da parte delle cellule infiammatorie è aumentata nella BPCO. Sulla base di queste evidenze, è probabile che nei polmoni dei pazienti con BPCO si venga a formare una maggiore quantità di perossinitrite. Tuttavia quale sia l'esatta sorgente cellulare della perossinitrite nei pazienti con BPCO non è chiaro. Uno studio precedente²⁴ ha mostrato che la produzione di perossinitrite era aumentata nei macrofagi e nei neutrofili delle vie aeree in pazienti con BPCO rispetto a soggetti sani di controllo. Pertanto, lo stress perossinitritico è marcatamente aumentato con il grado di gravità della BPCO. La perossinitrite può indurre direttamente danneggiamento o morte delle cellule epiteliali polmonari, poiché la perossinitrite è una specie altamente reattiva che era inizialmente considerata essere un importante mediatore di effetti citotossici.²⁵ Inoltre, uno studio precedente²⁶ ha riportato che la perossinitrite da un lato ossida l'inibitore della α_1 -proteinasi, favorendo così la suscettibilità del polmone a un non bilanciato attacco proteolitico sulla sua matrice extracellulare, dall'altro attiva le metalloproteinasi della matrice che vengono rilasciate dai neutrofili e dai macrofagi, e sono capaci di degradare tutti i componenti della matrice extracellulare del parenchima polmonare e possono determinare alterazioni in senso enfisematoso. Infatti, abbiamo dimostrato che lo stress perossinitritico era correlato significativamente con il grado di ostruzione delle vie aeree. In questo studio l'attività inibitrice perossinitritica è stata analizzata tramite il monitoraggio della formazione di rodamina. L'ossidazione della diidrorodamina 123 in rodamina è mediata dalla perossinitrite, ma non dall'anione superossido né dal perossido di idrogeno né da NO. Utilizzando questo metodo, abbiamo osservato che l'attività inibitoria della perossinitrite nell'espettorato indotto diminuisce con l'aumentare del grado di gravità della BPCO. Sembra probabile che il sottile strato liquido che ricopre l'epitelio (epithelial lining fluid) fornisca un'importante protezione anti-ossidante contro la perossinitrite e possa servire come una prima linea di difesa per le cellule epiteliali. Tuttavia, le cellule epiteliali sono anche la principale sorgente delle capacità anti-ossidanti presenti a livello dell'epithelial lining fluid. Pertanto, una riduzione dell'attività inibitrice perossinitritica potrebbe essere secondaria al danneggiamento o alla morte delle cellule epi-

teliali. Così, la presenza non adeguata di attività inibitrice perossinitritica renderebbe le cellule epiteliali maggiormente vulnerabili al danneggiamento cellulare mediato dalla perossinitrite. In base a quanto osservato da noi, è possibile speculare che la progressione della BPCO verso gradi di maggiore gravità possa essere il risultato di una riduzione dell'attività inibitrice perossinitritica. Inoltre, poiché la produzione di perossinitrite aumenta durante le riacacerbazioni della BPCO, una suscettibilità alla perossinitrite in questa fase della malattia potrebbe aumentare in maniera marcata con la gravità della malattia.

Tuttavia, l'infiammazione delle vie aeree potrebbe non essere il solo meccanismo responsabile della patogenesi della BPCO.²⁷ Per esempio, Kasahara e coll.¹² hanno dimostrato che il trattamento a lungo termine di ratti con un inibitore del recettore 2 del VEGF determina apoptosi delle cellule epiteliali ed endoteliali seguita da un allargamento degli spazi aerei senza tuttavia chiari segni di infiammazione acuta o cronica. Presi assieme, questi dati suggeriscono che l'infiammazione neutrofila e il conseguente stress perossinitritico potrebbero non essere i soli responsabili della BPCO. Tuttavia, noi abbiamo dimostrato che un aumento dello stress perossinitritico era presente perfino nei pazienti con BPCO di grado lieve. Pertanto, abbiamo ipotizzato che l'aumentato stress perossinitritico sia inizialmente associato con l'aumentata apoptosi delle cellule epiteliali presente perfino nei pazienti con i gradi più lievi di BPCO. Sebbene Kasahara e coll.¹² abbiano osservato in tessuti polmonari provenienti da pazienti con BPCO che sia le cellule epiteliali che le cellule endoteliali erano apoptotiche, le cellule in apoptosi erano soprattutto quelle epiteliali, le quali a loro volta condizionavano in maniera negativa le cellule endoteliali tramite una ridotta produzione del loro fattore di sopravvivenza, il VEGF.²⁸ Queste osservazioni suggeriscono che l'alterata funzione delle cellule epiteliali, che sono la principale sorgente di VEGF, possa determinare una ridotta espressione di VEGF e determinare un'aumentata apoptosi delle cellule endoteliali, così come osservato nella BPCO. Pertanto, è ragionevole ipotizzare che la riduzione del numero delle cellule endoteliali nella BPCO sia secondaria alla perdita di cellule epiteliali dovuta allo stress perossinitritico.

Un sempre crescente numero di evidenze suggerisce un ruolo diretto di una comunicazione intercellulare di tipo paracrino tra cellule endoteliali e circostanti cellule bersaglio tissutali.²⁹ Per esempio, è ampiamente dimostrato che i tessuti regolano l'architettura vascolare interagendo con le cellule endoteliali tramite agenti angiogenici locali come quelli appartenenti alla famiglia del VEGF. Dall'altro lato, le cellule endoteliali producono una varietà di fattori umorali, fattori di crescita e molecole di superficie

per comunicare con le cellule circostanti. A livello degli alveoli polmonari, le cellule epiteliali e le cellule endoteliali potrebbero anche utilizzare questo tipo di comunicazione intercellulare. Non è ancora chiaro, tuttavia, come il fattore di derivazione endoteliale che è normalmente presente a livello delle cellule endoteliali comunichi con le cellule epiteliali dei setti alveolari. Tuttavia, noi abbiamo dimostrato che una diminuzione del VEGF determina una marcata riduzione dell'attività inibitrice della perossinitrite, il che suggerisce ciò che la perdita di cellule endoteliali possa accelerare il danneggiamento o la morte delle cellule epiteliali. Infatti, un precedente studio³⁰ ha riportato che la perdita di VEGF determina un danneggiamento delle cellule epiteliali mediato dallo stress ossidativo e culmina con la BPCO. I risultati del presente studio potrebbero contribuire a meglio comprendere la patogenesi della BPCO, e i nostri dati supportano l'esistenza di una relazione tra alterato bilancio tra ossidanti-antiossidanti e omeostasi EGF-dipendente delle pareti alveolari a livello dei polmoni dei pazienti con BPCO.

RINGRAZIAMENTI: Gli autori ringraziano Yukari Matsuyama per il suo aiuto nella stesura e preparazione del manoscritto.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Repine JE, Bast A, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:341-357
- 2 van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, et al. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1-9
- 3 Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE, et al. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:854-858
- 4 Kanazawa H, Shoji S, Yoshikawa T, et al. Increased production of endogenous nitric oxide in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 1998; 10:1244-1250
- 5 Postma DS, Renkema TEJ, Noordhoek JA, et al. Association between nonspecific bronchial hyperreactivity and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes in chronic airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 57-61
- 6 Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:446-451
- 7 Radi R, Beckman JS, Bush KM, et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266:4244-4250
- 8 Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PAJ, et al. Peroxynitrite in airway disease. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1464-1473
- 9 Van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, et al. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1-9
- 10 Marla SS, Lee J, Groves JT. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:14243-14248
- 11 Kanazawa H, Shiraishi S, Hirata K, et al. Imbalance between levels of nitrogen oxides and peroxynitrite inhibitory activity in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2003; 58: 106-109
- 12 Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106:1311-1319
- 13 Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273:13313-13316
- 14 Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, et al. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:737-744
- 15 Kanazawa H, Hirata K, Yoshikawa J. Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med* 2003; 114:354-358
- 16 Thickett DR, Armstrong L, Millar AB. A role for vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1332-1337
- 17 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Workshop Report. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute, April 2001; Update of the management sections 2003
- 18 Phizackerley PJR, Al-Dabbagh SA. The estimation of nitrate and nitrite in saliva and urine. *Anal Biochem* 1983; 131:242-245
- 19 Kanazawa H, Shiraishi S, Hirata K, et al. Decreased peroxynitrite inhibitory activity in induced sputum in patients with bronchial asthma. *Thorax* 2002; 57:509-513
- 20 Crow JP, Beckman JS, McCord JM. Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite. *Biochemistry* 1995; 34:3544-3552
- 21 Kanazawa H, Hirata K, Yoshikawa J. Possible mechanism of bronchoconstriction by SIN-1 in anaesthetized guinea pigs: roles of nitric oxide and peroxynitrite. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:445-450
- 22 Peveri P, Walz A, Dewald B, et al. A neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1988; 167:1547-1559
- 23 Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2645-2653
- 24 Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, et al. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:701-706
- 25 Beckman JS. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* 1995; 34:17-43
- 26 Okamoto T, Akaike T, Nagano T, et al. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342:261-274
- 27 Lapperre TS, Snoeck-Stroband JB, Gosman MME, et al. Dissociation of lung function and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:499-504
- 28 Tsao P-N, Su Y-N, Li H, et al. Overexpression of placenta growth factor contributes to the pathogenesis of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:505-511
- 29 Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med* 2003; 9:661-668
- 30 Tuder RM, Zhen L, Cho CY, et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29:88-97