

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA

**IN FISIOPATOLOGIA SPERIMENTALE E DIAGNOSTICA
FUNZIONALE E PER IMMAGINI DEL SISTEMA CARDIO-
POLMONARE**

XXVIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

**“Caratterizzazione dei fenotipi e della risposta infiammatoria
delle vie aeree nell’asma da isocianati”**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Alfredo Antonio Chetta

Tutor: Ch.mo Prof. Piero Maestrelli

Dottoranda: Dott.ssa Paola Mason

A Giulia, Angela e Bruno

RIASSUNTO

Premesse: Nonostante l'asma sia stata considerata per anni come un'unica malattia, studi recenti ne dimostrano l'eterogeneità. L'intento di caratterizzare tale eterogeneità ha condotto a studiare molteplici sottogruppi ovvero "fenotipi". Nell'asma comune questo approccio è stato utilizzato da svariati anni, meno invece nell'asma occupazionale. Poco è noto anche riguardo alle caratteristiche della risposta infiammatoria nel corso dei test di provocazione bronchiale specifici (SIC) con isocianati valutata con metodiche non invasive; in particolare l'origine dell'incremento di ossido nitrico misurato ad un flusso espiratorio di 50 ml/s (FeNO50) precedentemente riscontrato, se sia alveolare o bronchiale, i livelli di dimetilarginina asimmetrica (ADMA) e la temperatura dell'aria espirata (EBT).

Scopi dello studio:

- 1) verificare se anche per l'asma occupazionale (OA) da isocianati siano individuabili dei fenotipi o se essa ne rappresenti uno unico
- 2) studiare l'infiammazione delle vie aeree sperimentalmente indotta tramite:
 - la misurazione dell'NO frazionato mediante i parametri "flow-independent" che stimano sia la regione alveolare, ovvero la concentrazione di NO alveolare (CaNO), che la regione bronchiale ovvero il flusso di NO a livello bronchiale (JawNO), la concentrazione di NO a livello della parete bronchiale (CawNO) e la diffusione di NO all'interfaccia lume-parete bronchiale (DawNO);
 - la misurazione dell'ADMA nel condensato dell'aria esalata (EBC);
 - la misurazione dell'EBT.

Materiali e metodi:

Per lo studio sulla fenotipizzazione dell'asma da isocianati sono stati esaminati pazienti risultati positivi al test di provocazione bronchiale specifico con isocianati nel periodo compreso tra il 1988 e il 2013. Mediante l'utilizzo di un approccio multivariato dato dall'analisi gerarchica dei cluster e di un ampio pool di variabili appropriate abbiamo studiato se i soggetti affetti da asma professionale da isocianati rappresentino uno o più cluster. Mediante un altro approccio

multivariato, dato dall'analisi delle k-medie, si sono individuate le caratteristiche che differenziano in maniera significativa i soggetti distribuiti nei diversi cluster.

Per il secondo scopo dello studio dal 2012 al 2015 abbiamo reclutato soggetti afferiti presso il nostro centro per sospetta asma professionale. In questi pazienti in corso di sham-test e di SIC con isocianati fino a 24 post test sono stati monitorati e misurati: la funzionalità respiratoria incluso il test di provocazione bronchiale aspecifico con metacolina, l'NO frazionato, l'ADMA nell'EBC e l'EBT.

Risultati:

L'utilizzo dell'analisi gerarchica dei cluster ci ha portati a stabilire che i 187 pazienti studiati non costituiscono un unico gruppo omogeneo ma possono essere suddivisi in 3 cluster. L'applicazione poi del metodo multivariato delle k-medie, su tre cluster, ci ha consentito di individuare due cluster di pazienti sensibilizzati a TDI con prevalente risposta late al SIC e un cluster di pazienti sensibilizzati a MDI con prevalente risposta early al SIC. I soggetti appartenenti ai due cluster dei TDI differiscono fra di loro in maniera significativa per l'età alla diagnosi e all'esordio dei sintomi respiratori, la distribuzione per sesso, il BMI, la distribuzione in quanto abitudine al fumo, l'IT, il FEV1 basale % del predetto, l'età di inizio esposizione, gli anni di latenza e la durata dell'esposizione.

Per quanto riguarda invece lo studio del profilo infiammatorio delle vie aeree abbiamo reclutato 25 pazienti, 18 maschi e 7 femmine. Nel gruppo dei SIC-positivi FeNO50 è aumentato significativamente a 24 ore dal test (mediana 111.8 ppb [IQR, 167.5]; $p < 0.05$) se confrontato con lo sham (58.6 ppb [74.7]). I livelli di JawNO hanno manifestato il medesimo time-course con un incremento significativo post 24 ore dall'esposizione (6.6 nL/s [81]; $p < 0.05$) se confrontato con lo sham (3.3 nL/s [3.7]). Non sono state riscontrate significative variazioni negli altri parametri. Non sono state riscontrate significative variazioni dell'ADMA nell'EBC e dell'EBT in entrambi i gruppi.

Conclusioni: L'asma da isocianati è una patologia eterogenea come l'asma comune. Gli elementi principali che differenziano i cluster di asma professionale da isocianati sono l'agente sensibilizzante e il tipo di risposta al SIC (cluster 3 vs cluster 1 e 2). Anche nell'ambito dell'asma indotta dallo stesso agente (TDI) si sono evidenziati due cluster in cui quello con peggiore funzionalità respiratoria è rappresentato da soggetti più anziani alla diagnosi e con maggiore durata dell'esposizione. I motivi per cui l'asma occupazionale risulta essere eterogenea possono essere un differente meccanismo d'azione dei monomeri o una diversa suscettibilità degli individui appartenenti ai diversi cluster sia in termini di insorgenza della malattia sia in termini di evoluzione della stessa.

L'assetto infiammatorio delle vie aeree nel corso del SIC non si caratterizza nei soggetti sensibilizzati ad isocianati né con un incremento dell'ADMA né con un incremento dell'EBT. Si riscontra invece un aumento di FeNO50 dovuto esclusivamente ad un aumentato flusso di NO dalla parete bronchiale al lume. Abbiamo perciò dimostrato che la misurazione del FeNO50 nel corso del SIC può fornire informazioni aggiuntive al monitoraggio funzionale spirometrico, anche perché la broncoostruzione e la risposta infiammatoria delle vie aeree si sono rivelate dissociate.

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 8
SCOPO DELLA TESI	pag. 51
MATERIALI E METODI	pag. 52
RISULTATI	pag. 59
DISCUSSIONE	pag. 79
CONCLUSIONI	pag. 88
BIBLIOGRAFIA	pag. 89

INTRODUZIONE

L'asma come malattia professionale

L'asma rappresenta una delle più frequenti malattie croniche dell'apparato respiratorio, colpendo circa l'1%-21 % della popolazione mondiale [To, 2012]. Il 5-25% dei casi di asma nell'adulto risulta essere correlata al lavoro [Ameille et al, 2006; Kogevinas et al, 2007; Toren et al, 2000]. La sua incidenza è generalmente compresa tra 50 e 140 casi per milione di lavoratori/anno e in alcuni ambienti di lavoro raggiunge 1300 casi per milione di lavoratori/anno [Latza et al, 2005]. Essa causa una significativa morbidità e disabilità, in quanto, anche dopo la cessazione dell'esposizione, spesso persiste un'iperresponsività bronchiale aspecifica, associata ad infiammazione cronica delle vie aeree. I fattori di rischio per la persistenza dei sintomi asmatici sono la durata dell'esposizione, la durata dei sintomi prima della rimozione dall'esposizione e la severità dell'asma al momento della diagnosi [Lombardo et al, 2000; Paggiaro et al, 1994]. Da recenti studi è emerso inoltre che l'età avanzata, le sostanze ad alto peso molecolare, una funzionalità polmonare compromessa e una lunga durata di esposizione lavorativa all'agente sensibilizzante al momento della diagnosi hanno un ruolo negativo nei confronti dell'outcome dell'asma occupazionale; il fumo e l'atopia sembrerebbero invece non influenzarlo [Maestrelli et al, 2012]. L'asma occupazionale è definita come una malattia caratterizzata da una limitazione variabile del flusso, da iperresponsività delle vie aeree, o entrambe le condizioni, dovute alla esposizione a prodotti presenti nell'ambiente di lavoro e con nesso di causa con la malattia. Nell'ambito dell'asma professionale possono essere distinte due forme: asma di nuova insorgenza causata dall'esposizione a sostanze nell'ambiente di lavoro ad azione irritante o sensibilizzante, (con attivazione di due diverse vie eziopatogenetiche) ed asma preesistente, esacerbata dalle sostanze presenti sull'ambiente di lavoro [Bernstein et al, 1993; Maestrelli et al, 2006; Testi et al, 2009]. Tre studi in particolare evidenziano che la frequenza di quest'ultima è circa il 20-25% di tutti i casi di asma presente nei lavoratori [Saarinen et al, 2003; Henneberger et al, 2003; Henneberger et al, 2006].

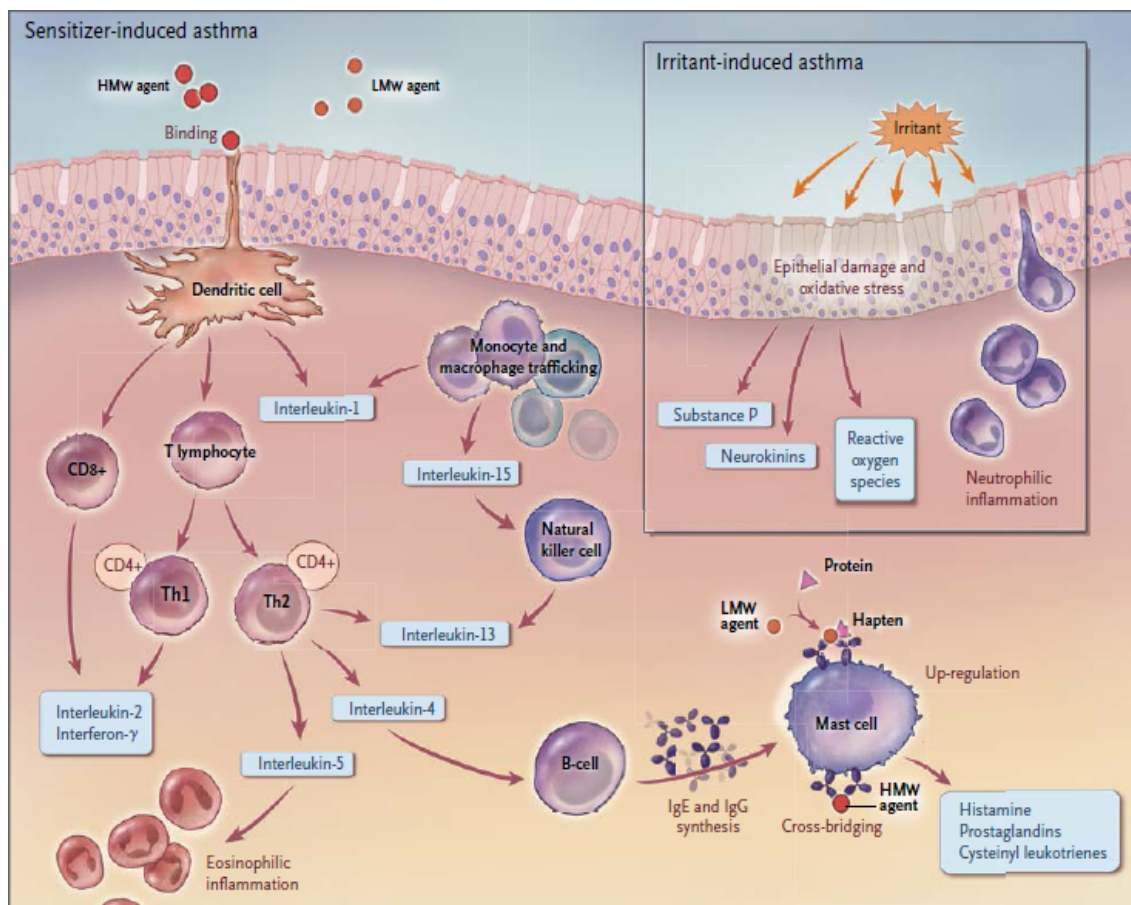


Fig.1: Meccanismi coinvolti nella patogenesi dell'asma indotta da sensibilizzanti e nell'asma indotta da irritanti.

Non si sa ancora quale livello di esposizione sia sicuro per evitare lo svilupparsi dell'asma occupazionale; probabilmente la concentrazione di sostanza capace di promuovere lo sviluppo della patologia è estremamente bassa; inoltre, quando è avvenuta la sensibilizzazione, il soggetto può presentare broncoostruzione a concentrazioni di sostanza inferiori rispetto a quelle che l'hanno provocata [Chan-Yeung et al, 1995]. L'asma professionale, al pari dell'asma non professionale, è una patologia multifattoriale, che dipende dell'interazione di fattori sia genetici, sia ambientali: la presenza di atopia e il fumo sembrano essere importanti fattori di rischio per l'asma occupazionale legata a meccanismo immunologico IgE mediato [Paggiaro et al, 1994]. Al contrario né l'atopia né il fumo rappresentano fattori di rischio nel caso di asma professionale non mediato da IgE [Paggiaro et al, 1994; Venables et al, 1997; Siracusa et al, 1995]. Un recente articolo spiega inoltre come l'asma occupazionale sia in molti casi prevenibile con alcuni accorgimenti di prevenzione primaria, secondaria e terziaria e come, quando questo non risultasse possibile, sia fondamentale una diagnosi precoce della patologia asmatica, già ai primi sintomi respiratori, al fine di ridurre le conseguenze sulle condizioni di salute ma anche l'impatto sulla storia lavorativa dell'individuo [Tarlo et al,

2014]. In particolare nella prevenzione primaria dell'asma professionale indotta da agenti sensibilizzanti risulta fondamentale evitare l'introduzione nei posti di lavoro di nuovi agenti ad azione sensibilizzante, sostituire gli agenti sensibilizzanti già in uso con agenti più sicuri, modificare la forma chimica o fisica dell'agente noto al fine di ridurne il rischio espositivo, ridurre l'esposizione mettendo in atto misure di tipo igienistico, educare il lavoratore ai rischi ed indurlo all'uso di pratiche di sicurezza ed eseguire adeguati monitoraggi ambientali [Heederik et al, 2012; Tarlo et al, 2010].

Agenti sensibilizzanti coinvolti nella patogenesi dell'asma professionale

Sono state descritte circa 350 sostanze in grado di causare asma professionale [Bernstein et al, 1993; Testi et al, 2009; Chan-Yeung et al, 1994; Moscato et al, 2002]. Da diversi studi che hanno considerato tutti i casi di asma professionale diagnosticati in 6 centri specializzati del nord e centro Italia nel periodo fra il 1992 e il 1997 [Testi et al, 2009; Moscato et al, 2002; Mapp et al, 2005] emerse che, nonostante la numerosità degli asmogeni professionali, più dell'80% di tutti i casi di asma occupazionale sono riconducibili a sole cinque cause: gli isocianati (42%), che sono i principali agenti eziologici, per la loro ampia diffusione e le loro caratteristiche chimico-fisiche intrinseche, le farine di cereali (20%), a cui sono esposti mugnai, fornai e pasticceri, le polveri di legni esotici (10%), il lattice contenuto nei guanti usati dagli operatori sanitari (8%) e i persolfati (5%), usati dai parrucchieri per la decolorazione dei capelli. (fig. 2). Un ulteriore recente dato sulla distribuzione eziologica dell'asma professionale è quello relativo ad uno studio osservazionale sui 419 casi di asma professionale diagnosticati presso l'U.O.C. di Medicina del Lavoro dell'Università di Padova tra il 1987 e il 2011 [Guarnieri et al, 2011]. Di questi, 387 erano lavoratori locali e 32 lavoratori migranti. La percentuale di casi dovuti a isocianati è risultata essere maggiore nei lavoratori migranti: 68.7% contro il 52.7% nei lavoratori locali, anche se la differenza non è risultata statisticamente significativa. È da segnalare comunque che in entrambi i casi le percentuali dei casi dovuti ad isocianati sono risultate maggiori di quelle evidenziate dallo studio di Moscato e coll. La differenza è attribuibile soprattutto alla diversa zona geografica presa in esame dagli studi (il centro-nord Italia per Moscato e coll., il nord-est per Guarnieri e coll.) ed al differente grado e tipologia di insediamenti industriali. Infine un'ulteriore studio condotto nel 2006 e che ha valutato 6 studi effettuati dal 1998 al 2002 in Francia, Regno Unito, Finlandia, Canada, USA, Sud Africa e Belgio ha mostrato una percentuale di casi di

asma professionale dovuta a isocianati varia dal 4,8 al 19,9% (media 14,6%) [Ameille et al, 2006].

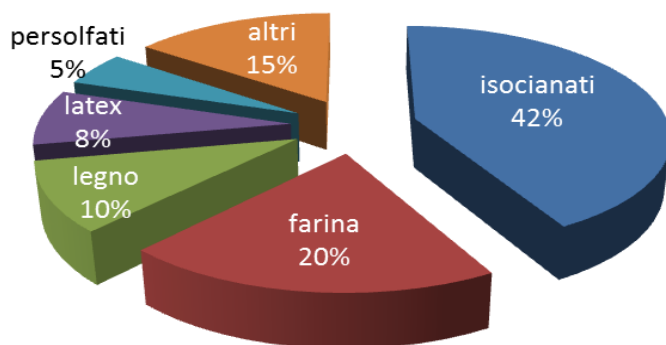


Fig. 2: Principali cause di asma professionale nel Nord Italia (1992-1997).

È possibile suddividere le sostanze coinvolte nella patogenesi dell'asma professionale in due categorie principali:

1. Agenti non sensibilizzanti, che comprendono gas irritanti (ozono, NO₂) ed agenti con attività farmacologica (organo fosforici inibitori dell'acetilcolinesterasi)
2. Agenti sensibilizzanti distinti in sostanze ad alto e a basso peso molecolare

Le sostanze ad alto peso molecolare (>5000 Da), come proteine di origine vegetale ad animale, si comportano da antigeni completi, mentre le sostanze a basso peso molecolare (<5000 Da), quali isocianati, acido plicatico (contenuto nel legno di cedro rosso), metalli ed anidridi acide, sono apteni, cioè reagiscono con le proteine (autologhe o eterologhe) per dare origine all'antigene completo [Paggiaro et al, 1994].

Nel 90% circa dei casi, soprattutto per le sostanze ad alto peso molecolare, il meccanismo patogenetico alla base della patologia è immunologico, IgE o non IgE correlato: l'elemento caratteristico è la presenza di un periodo di latenza; tipicamente la sintomatologia compare mentre il soggetto si trova nell'ambiente di lavoro, o alla fine della giornata lavorativa, e si attenua durante i periodi di allontanamento dall'ambiente lavorativo. Il rimanente 10% è legato ad un meccanismo non immunologico di tipo irritativo, che si verifica in seguito all'esposizione a sostanze ad altissime concentrazioni, capaci di indurre danno ed infiammazione a livello delle vie aeree: si parla di RADS. A differenza di quella legata a meccanismo immunologico, questo tipo di asma occupazionale non presenta un tempo di latenza, e deve essere sospettato se la sintomatologia compare entro 24 ore dall'esposizione [Bernstein et al, 1993; Testi et al, 2009; Chan-Yeung et al, 1995; Mapp et al, 2005].

Gli isocianati

Gli isocianati sono composti chimici caratterizzati da un gruppo isocianico – $N=C=O$ altamente reattivo, che è in grado di legare radicali aromatici, alifatici e ciclo alifatici [Baur et al, 1994]. La capacità degli isocianati di reagire con composti contenenti atomi di idrogeno spiega il loro ampio impiego nell'industria automobilistica, del mobile, calzaturiera e nella coibentazione dei frigoriferi [MUSK et al, 1988]. I più utilizzati sono il toluene diisocianato (TDI), l'esametilene diisocianato (HDI) e il metilen-4-4-diisocianato (MDI) [Vainio et al, 1999]. I suddetti monomeri di isocianati sono presenti come componenti di vernici poliuretatiche, smalti, adesivi, schiume rigide e flessibili, elastomeri, materiale isolante di sigillanti, anime di fonderia, rivestimenti protettivi per impianti elettrici e insetticidi [Sari-Minodier et al, 1999].

Il TDI e l'HDI sono relativamente volatili anche a temperatura ambiente, mentre l'MDI è solido e pertanto deve essere riscaldato per raggiungere lo stato gassoso [Bernstein et al, 1996]. Gli isocianati possono essere inalati sotto forma di vapori o aerosol, prodotti per esempio nella verniciatura a spruzzo o per decomposizione termica dei poliuretani (polimeri di isocianati), per esempio durante operazioni di saldatura di superfici precedentemente trattate [Bernstein et al, 1996] e comunque variabile nelle diverse lavorazioni [Sari-Minodier et al, 1999].

Oltre all'asma, gli isocianati possono determinare raramente alveolite allergica [Selden et al, 1989; Matline et al, 2008] e bronchite cronica. Sono classificati dalla IARC (International Agency for Research on Cancer) come appartenenti alla classe 2B [Bucher et al, 1989], cioè come sostanze potenzialmente cancerogene, non essendoci dati sufficienti per dimostrare la cancerogenicità nell'uomo, ma essendoci evidenza di tale effetto negli animali [Lee et al, 1994]. Gli isocianati sono in grado di modificare le proteine a cui si legano e di alterare gli acidi nucleici, causando quindi, potenzialmente, mutazioni e cancro [Bremner et al, 2005].

In base al tempo che trascorre tra l'esposizione all'agente sensibilizzante e la comparsa del broncospasmo, si possono classificare le reazioni asmatiche in diverse forme:

- Early (precoci): dovute al rilascio di mediatori preformati come l'istamina. Compaiono in tempi molto rapidi, quindi in ambito professionale colpiscono il paziente durante l'attività lavorativa, poco dopo l'inizio dell'esposizione alla sostanza responsabile.
- Late (tardive): dovute alla sintesi ex-novo di citochine, derivati dell'acido arachidonico e all'attivazione degli eosinofili. Compaiono dopo almeno 4 ore dall'esposizione

e possono durarne fino a 24. In ambito professionale spesso colpiscono il paziente dopo la fine del turno di lavoro, durante la sera o la notte, rendendo il sospetto diagnostico più difficile da formulare.

- Dual: quando sono presenti entrambe le componenti.

Gli isocianati, come tutti gli agenti a basso peso molecolare rispetto agli agenti ad alto peso molecolare, tendono a dare più frequentemente reazioni di tipo late. Questo sembra essere dovuto al diverso tipo di risposta immunitaria che innescano.

La diagnosi di asma professionale da isocianati può essere difficile da evidenziare. Essa si basa in particolare su:

- una storia clinica compatibile (episodi di sibili, oppressione toracica, tosse e dispnea), che tuttavia, anche se indicativa, predice la diagnosi solo nel 63% dei casi essendo un criterio sensibile, ma poco specifico [Malo et al, 1991];
- raccolta dell'anamnesi lavorativa (integrata all'anamnesi patologica prossima) che costituisce un primo passo fondamentale. Non solo lo specialista in medicina del lavoro, ma anche lo pneumologo e il medico di base dovrebbero indagare l'eventuale presenza di fattori di rischio in ambito lavorativo nei casi di asma con esordio nell'età adulta o con peggioramento inspiegabile di malattia pre-esistente. Questo è essenziale per formulare il sospetto diagnostico di malattia professionale e quindi avviare l'iter diagnostico.
- l'esistenza di una correlazione tra sintomi e attività lavorativa, dimostrata con il test arresto/ripresa: esso consiste nella presentazione della sintomatologia in seguito all'esposizione sull'ambiente di lavoro e alla sua scomparsa o attenuazione durante periodi di allontanamento dall'attività lavorativa. Un ulteriore step per la diagnosi di asma bronchiale e la conferma della relazione temporale tra l'attività lavorativa e la broncoostruzione è la misura seriata del picco di flusso espiratorio (PEF) che viene utilizzata per valutare l'associazione tra attività lavorativa e funzionalità respiratoria [Cote' et al, 1990; Park et al, 2009]. Tale metodica non ha però una buona specificità e sensibilità e presenta dei limiti, come la bassa compliance del soggetto, la potenziale falsificazione dei risultati e la sottostima delle modificazioni di calibro delle vie aeree [Moscato et al, 1995].

Il gold standard per la diagnosi di asma da isocianati è rappresentato dal test di broncostimolazione specifico, che può indurre reazioni immediate (entro la prima ora dall'esposizione) o ritardate (dopo la prima ora dall'esposizione). Questo test è tuttavia

costoso, lungo e richiede un'organizzazione complessa e una strumentazione adeguata; può pertanto essere eseguito solo in centri specializzati. In alcuni casi non si osserva una broncoostruzione significativa dopo l'esposizione specifica, ma la PD₂₀ del test con metacolina effettuato dopo l'esposizione si abbassa notevolmente, denotando un aumento della reattività bronchiale che permette comunque di porre diagnosi.

Fenotipi di asma bronchiale

Nonostante l'asma (dal greco *ασθμα*, che significa “difficoltà di respiro”) sia stata considerata per anni come un'unica malattia, studi recenti ne dimostrano l'assoluta eterogeneità. L'intento di caratterizzare tale eterogeneità ha condotto a promuovere l'individuazione di molteplici sottogruppi ovvero di “fenotipi” inizialmente costruiti sulla base delle uniche caratteristiche cliniche dei soggetti e solo da breve tempo anche tenendo conto delle peculiarità biologiche e molecolari di ciascuno che spiegano le proprietà osservabili di un fenotipo ovvero gli “endotipi”.

Tale approccio sia clinico che molecolare è stato finora poco utilizzato per lo studio dell'asma occupazionale (OA), malattia dovuta a cause e condizioni attribuibili ad un particolare ambiente di lavoro (Figg 3 e 4).

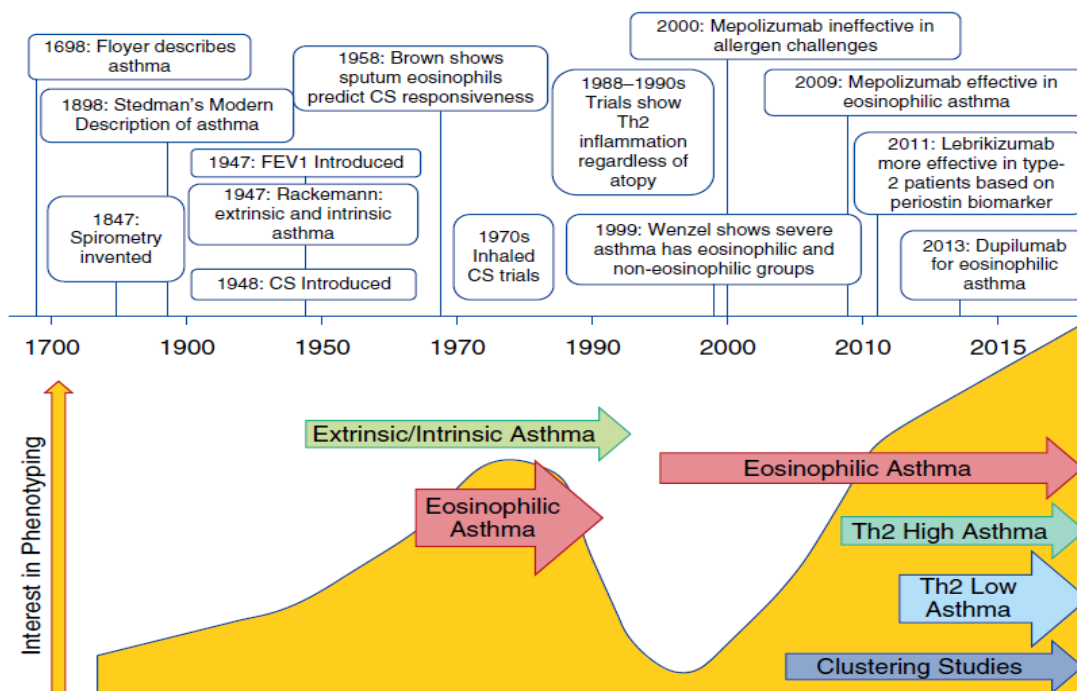


Fig. 3: Evoluzione nello studio dell'asma e dei suoi fenotipi da Gauthier et al, 2015.

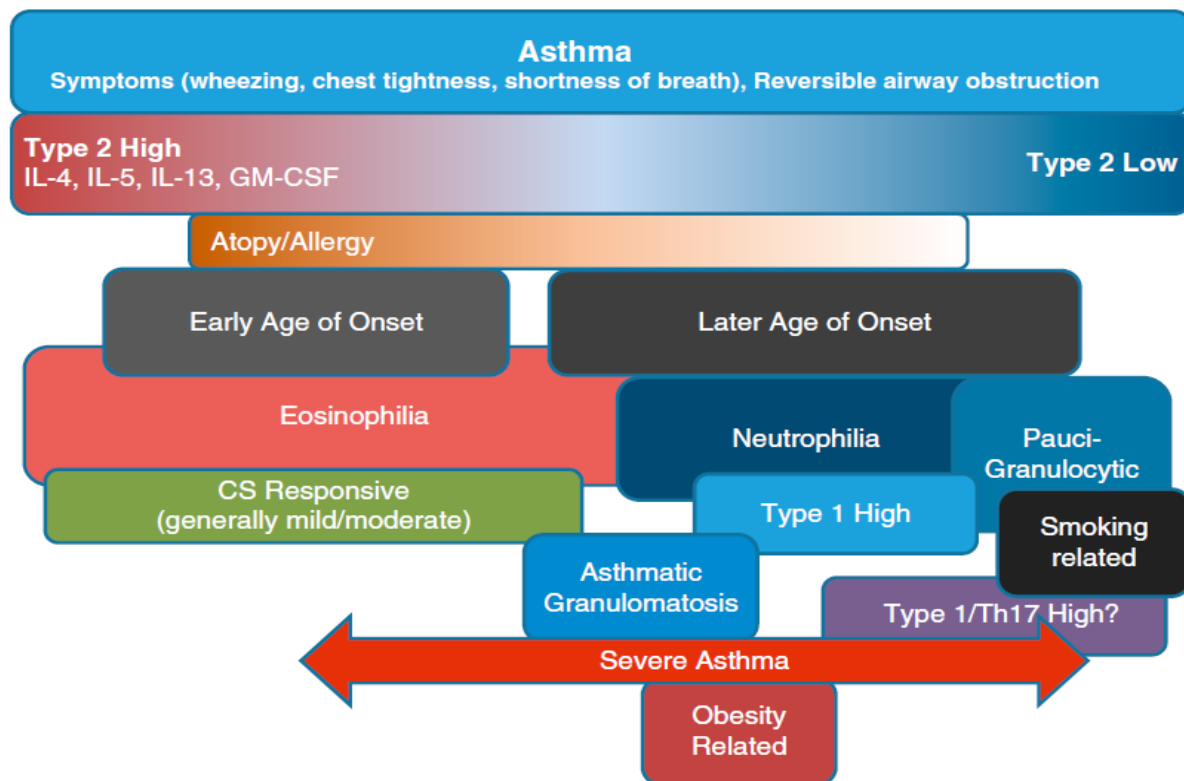


Fig.4: Esempio schematico di fenotipizzazione dell’asma bronchiale in relazione al quadro infiammatorio, type-2 high o low – da Gauthier et al, 2015-.

Come suddetto l’asma comprende un gruppo di sintomi clinici diversamente aggregati tra di loro che si associano dal punto di vista funzionale ad una broncoostruzione reversibile e/o ad una iperreattività bronchiale aspecifica e a diversi quadri di tipo infiammatorio [Moore et al, 2010; Patrawalla et al, 2012; Wenzel et al, 2012, Gauthier et al, 2015]. Quindi tale termine, come ad esempio il quello di “artrite”, comprende un gruppo di caratteristiche cliniche e fisiologiche, che riunite assieme in diverso modo possono definire sindromi, fenotipi o patologie complesse. Nonostante poi le linee guida per la definizione dell’asma parlino di “presenza di infiammazione delle vie aeree” nella lista dei criteri da considerare per fare

diagnosi di malattia, nella pratica clinica lo stato di infiammazione è poco studiato e raramente confermato [Wenzel et al, 2012].

Anche l'autorevole "The Lancet" ha suggerito che il termine asma è ormai inadatto e che la scoperta di maggiori dettagli clinici e biologici deve incoraggiare ad una nuova definizione di questa condizione patologica [Editorial Lancet, 2006]. Per definizione un fenotipo è l'insieme di tutte le proprietà osservabili di un organismo che si producono dall'interazione fra il genotipo (bagaglio genetico) e l'ambiente [Merriam-Webster's, 2008]. Il concetto di fenotipo è strettamente correlato con l'endotipo attraverso l'attivazione di una specifica via biologica che porta all'estrinsicazione delle proprietà riconoscibili poi nel fenotipo [Anderson et al 2008; Lötvall, 2011]. Nonostante numerosi endotipi di asma siano già stati proposti, nessuno di questi è stato veramente accettato e l'argomento è ad oggi controverso. Allo stesso modo anche i fenotipi basati sulle caratteristiche cliniche e sui processi infiammatori sono in via di definizione e saranno necessari altri studi per capire come associare le varie caratteristiche [Wenzel et al, 2006].

L'approccio nella fenotipizzazione dell'asma può essere condotto con analisi:

- *univariata*. Questo tipo di fenotipizzazione, che utilizza una definizione a priori del fenotipo basata sull'individuazione di una caratteristica clinica, funzionale, biologica ritenuta prevalente, iniziò già parecchie decadi fa con il concetto di asma allergico e non allergico o estrinseco ed intrinseco [Rackemann et al, 1947]. Numerosi studi osservazionali hanno infatti mostrato come i pazienti con asma estrinseco sviluppassero precocemente la malattia, fossero atopici, avessero altre manifestazioni cliniche su base allergica come rinite e/o dermatite e avessero familiarità per malattia allergica mentre quelli con asma intrinseco sviluppassero più tardi la malattia (dopo i 40 anni), avessero un'asma associata ad esacerbazione con l'assunzione di aspirina ma in assenza di una sensibilizzazione allergica. Evidenziato però il fatto che in entrambi i tipi di asma è possibile ritrovare citochine del tipo Th2 a livelli simili e che simile è anche la risposta al trattamento con corticosteroidi, l'interesse per la distinzione nei due fenotipi è venuto meno [Humbert et al, 1996; GINA, 2008]. L'evidenza però mediante nuovi studi eseguiti nel 1990 di forme di asma bronchiale più severa e refrattaria alla terapia, con componente neutrofilica dell'infiammazione, prima mai individuata, ha reintrodotto il concetto di eterogeneità dell'asma [Wenzel et al, 1997]. Nelle forme di asma severa si è visto peraltro come nel 50% della casistica studiata fossero presenti eosinofili a livello del tessuto polmonare, la membrana basale sub epiteliale fosse più spessa, ci fosse una maggiore espressione del TGFβ, i sintomi fossero più frequenti e più severi e ci fossero più eventi del

tipo near-fatal [Wenzel et al, 1999; Miranda et al, 2004; Pizzichini et al, 1999; Gibson et al, 2003]. In un altro studio è stata considerata l'età d'esordio della malattia (con cut-off a 12 anni) come fattore dirimente per discriminare le forme di asma allergico da quelle meno definite ma comunque con esordio in età adulta e con maggior componente eosinofila [Miranda et al, 2004]. Sostanzialmente sono stati proposti con questo sistema di analisi diversi fenotipi di asma come quella indotto dall'esercizio fisico, correlata all'obesità, correlata al fumo, neutrofila o paucigranulocitica (in assenza di un processo infiammatorio ben definito) ma troppo poche risultano le caratteristiche cliniche e biologiche corrispondenti ritrovate [Wenzel, 2012]. Wenzel e coll. con un articolo pubblicato nel 2007 ha definito le potenziali categorie fenotipiche dell'asma, suddividendola in fenotipi clinici e fisiopatologici (asma lieve e grave, ad elevato rischio di riacutizzazione, con ostruzione non reversibile, resistente al trattamento corticosteroidico, definita in base all'età di insorgenza), fenotipi correlati ai fattori di scatenamento (intolleranza ai FANS, sensibile ad allergeni ambientali, asma occupazionale, mestruale e da esercizio) e fenotipi infiammatori (eosinofilo, neutrofilo, paucigranulocitario) [Wenzel et al, 2007]. Diversi studi hanno cercato di evidenziare le caratteristiche cliniche che caratterizzano l'asma severa dalla lieve: obesità ed atopia per ENFUMOSA [The Enfumosa Study Group, 2003], frequenti riacutizzazioni e maggior numero di comorbidità associate come rinosinusite cronica, reflusso gastroesofageo, disordini psicosociali, OSAS, malattie tiroidee per Leiden e coll. [Ten Brinke et al, 2005], BMI>35, FEV1<70%, storia di polmonite, cataratta, intubazione per asma, uso di 3 scatole di steroidi negli ultimi 3 mesi per TENOR [Miller et al, 2006], ed esordio precoce, basso FEV1, storia di riacutizzazione dopo FANS o primo mestruo per SARP [Moore et al, 2007]. A sua volta l'asma grave, in considerazione della sua eterogeneità è stata suddivisa in ulteriori sottofenotipi rappresentati dall'asma con frequenti riacutizzazioni ed episodi di asma quasi fatale, asma con ostruzione bronchiale non reversibile ed asma corticodipendente o resistente [Mannino et al, 2000]. Ten Brinke ha caratterizzato il fenotipo dei pazienti affetti da asma con ostruzione non reversibile con caratteristiche quali insorgenza tardiva, basso valore di FEV1 in infanzia, frequenti riacutizzazioni, abitudine tabagica, infiammazione eosinofila non controllata dalla terapia, elevato grado di iperresponsività bronchiale ed esposizione professionale [Ten Brinke et al, 2008]. Studi recenti hanno poi individuato come il fenotipo di asma estrinseca si caratterizzi per un'ottima risposta alla terapia steroidea, una buona risposta all'immunoterapia specifica e alla terapia monoclonale con anti IgE (omalizumab) [Miller et al, 2006] ed il fenotipo di asma associato ad intolleranza ai FANS si ritrovi più di frequente in donne, in età adulta, raramente atopiche, con eosinofilia tissutale ed aumento degli eosinofili a

livello ematico, con aumentata produzione di leucotrieni ed in associazione con sinusite cronica iperplasica, anosmia e poliposi nasale [Borish et al, 2008];

- *multivariata*. Tale analisi è definita anche dei cluster e consente di riunire i pazienti in gruppi secondo diverse variabili utilizzate come misura di similarità. Tale analisi ha l'obiettivo, partendo da un collettivo multidimensionato, di assegnare le singole unità a categorie non definite a priori, formando dei gruppi omogenei al loro interno ed eterogenei tra di loro. Gli algoritmi di clustering raggruppano gli elementi sulla base della loro distanza reciproca (similarità/dissimilarità) e quindi all'appartenenza o meno ad un insieme dipende da quanto l'elemento preso in esame è distante dall'insieme stesso. Haldar e coll hanno considerato 3 gruppi di pazienti; uno con asma lieve-moderato inviati dal medico di medicina generale (184 pz), il secondo con asma moderato-severa in follow-up ambulatoriale specialistico (187 pz) ed il terzo con asma refrattaria (64 pz) [Haldar et al, 2008]. Di tutti i pazienti sono state raccolte informazioni comprendenti 22 variabili cliniche, fisiopatologiche e riguardanti marcatori flogistici, espettorato indotto e concentrazione di NO esalato. L'analisi di cluster, eseguita nelle prime 2 popolazioni, considerando principalmente parametri legati alla sintomatologia ed al quadro infiammatorio, ha portato alla distinzione rispettivamente in 3 e 4 cluster solo in parte concordanti nelle due popolazioni. In entrambi i gruppi si è individuata la presenza del cluster di asma allergico ad esordio precoce caratterizzato da una concordanza fra sintomi, infiammazione e livello di ostruzione delle vie aeree ed il cluster dei pazienti obesi con infiammazione di tipo non eosinofila, prevalentemente donne con esordio tardivo dei sintomi che risultano espressi in maniera rilevante. Come cluster non concordanti sono risultati, nella prima popolazione, quello dell'asma benigna, ovvero con prognosi favorevole per presenza di un quadro sintomatologico ed infiammatorio ben controllato e nella seconda popolazione quello con importante sintomatologia e scarsa infiammazione ad esordio precoce, in soggetti atopici con normale BMI e quello con scarsa espressione sintomatologica quotidiana ma importante quadro infiammatorio eosinofilo, più tipico del genere maschile e ad esordio tardivo. Lo studio ha quindi dimostrato come nei cluster di asma benigna e asma atopica ad esordio precoce la valutazione dei sintomi sia un parametro sufficiente per la titolazione della terapia, come nel cluster con quadro infiammatorio dominante il monitoraggio dello stato infiammatorio sia rilevante ai fini del dosaggio della terapia corticosteroidea e al fine di ridurre la frequenza delle riacutizzazioni ed infine come nei cluster di soggetti obesi con infiammazione non eosinofila ed in quello con sintomatologia predominante il monitoraggio dello stato di infiammazione non sia utile ai fini della scelta terapeutica (Fig. 5)

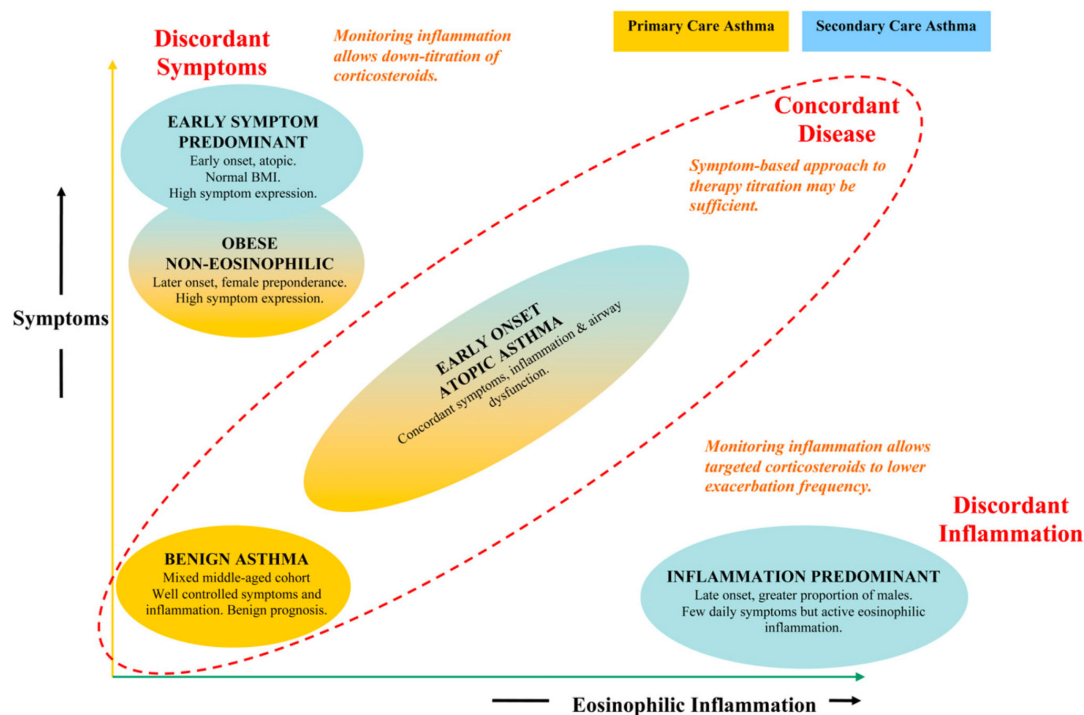


Fig.5: Fenotipi clinici di asma bronchiale secondo Haldar e coll.

Uno studio di Moore e collaboratori del 2010 ha identificato, mediante un'analisi gerarchica dei cluster, in una corte di 726 soggetti affetti da asma, di cui 304 presentavano i criteri ATS di asma severo, previamente suddivisi, mediante un analisi univariata, in asmatici lievi, moderati e gravi, 5 diversi cluster [Moore et al, 2010]. Partendo dalle 628 variabili inizialmente a disposizione, l'analisi è stata condotta prima su 34 variabili, con l'eliminazione di quelle riportanti dati ridondanti e con la trasformazione delle variabili categoriali in variabili composte e successivamente su 11 variabili che rappresentavano le più discriminative (funzionalità respiratoria, età d'esordio e durata della malattia, atopia, sesso, sintomi, impiego di farmaci e risorse sanitarie); un'ulteriore semplificazione dell'analisi è stata ottenuta individuando come per l'80% dei pazienti fossero sufficienti solamente tre parametri, ovvero FEV1 basale e massimale % del predetto ed età d'esordio dei sintomi, per l'assegnazione dei pazienti stessi al loro cluster (Fig 6). Il più rappresentato è risultato il cluster 2 (321 pz) costituito da pazienti atopici, con asma ad esordio precoce, con funzionalità respiratoria conservata ma richiedenti un incremento progressivo dei trattamenti farmacologici (utilizzo di 3 o più farmaci contemporaneamente nel 29% dei casi), seguito dai cluster 4 (120 pz) e 5 (116 pz) rappresentati da pazienti simili per avere un quadro ostruttivo severo secondo i criteri dell'ATS, comunque reversibile con la somministrazione di broncodilatatori anche se non in maniera completa per il cluster 5, ma differenti nello stato di atopia e nella risposta alla somministrazione di corticosteroidi orali. Infine meno rappresentati

sono risultati il cluster 1, con 110 pazienti con asma atopico, ad esordio precoce ed in assenza di un quadro ostruttivo, trattati con massimo due farmaci ed utilizzanti in maniera scarsa i servizi sanitari disponibili ed il cluster 3, con 59 pazienti prevalentemente donne anziane, obese, non atopiche, con asma ad insorgenza tardiva, moderata riduzione del FEV1 e frequente utilizzo di corticosteroidi orali per il controllo delle riacutizzazioni.

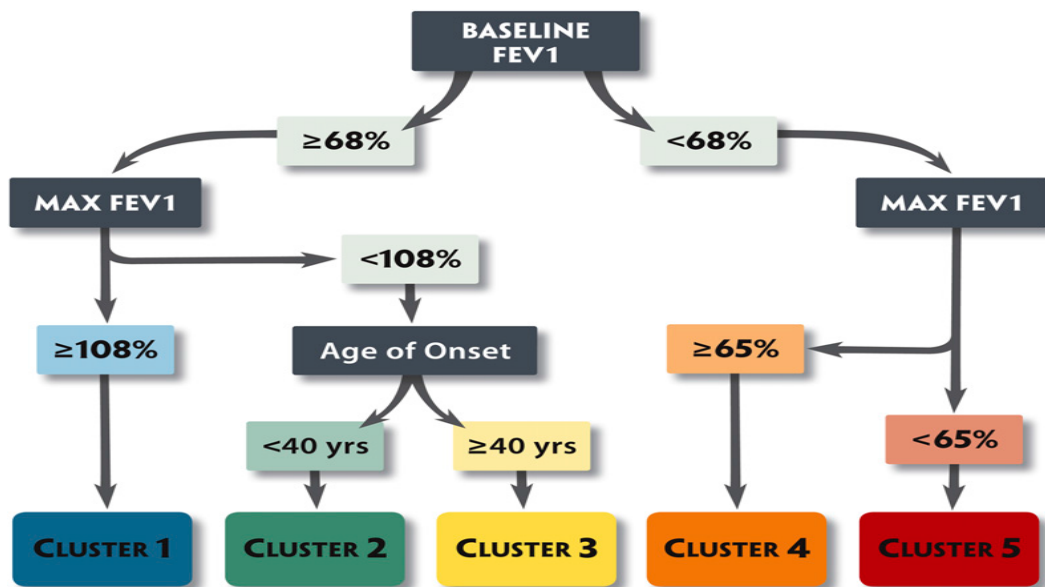


Fig. 6: Algoritmo semplificato di Moore et al.

Patrawalla e coll. hanno applicato lo stesso algoritmo semplificato proposto da Moore ad una popolazione di asmatici adulti (471) reclutati dal Registro degli asmatici dell'Università di New York e di Bellevue (NYUBAR) [Patrawalla et al, 2012]. La fenotipizzazione clinica dei 5 gruppi generata dall'algoritmo ha permesso la suddivisione in cluster anche di questa diversa popolazione di asmatici, con una distribuzione simile a quella descritta da Moore. In particolare sono stati inclusi nei cluster 1 e 2 (rispettivamente 2% e 63%) pazienti con esordio in giovane età della malattia ed atopici, nel cluster 3 (10%) donne, più anziane e con esordio tardivo della malattia, obese, meno atopiche e con numerose esacerbazioni, nei cluster 4 e 5 (20%) pazienti più vecchi e con una più lunga durata della malattia, con maggiori sintomi ed esacerbazioni e relativamente al gruppo 4 con una maggiore percentuale di atopia ed una maggiore concentrazione di eosinofili a livello periferico. Sutherland ha proposto invece una fenotipizzazione dei pazienti asmatici tenendo conto della presenza o meno di una condizione di obesità, basata sui valori di BMI e delle variabili ad esso associate. Sono stati individuati 4 diversi cluster, considerando in particolare i valori del BMI e il grado di severità della

sintomatologia indicato dall'AEQ score (Asthma Evaluation Questionnaire Score) [Sutherland et al, 2012]. Due cluster sono risultati costituiti da pazienti non obesi, rispettivamente femmine e maschie gli altri due cluster da pazienti obesi (BMI medio: 34 e 38), rispettivamente con asma non controllata e ben controllata. Le principali differenze nei 2 cluster di pazienti obesi sono risultate l'età di insorgenza della malattia, la sintomatologia riferita, la concentrazione di NO esalato, l'iperreattività bronchiale aspecifica; essi invece sono risultati simili in quanto a funzionalità respiratoria (FEV1 % e FEV1/CVF), eosinofilia a livello delle vie aeree, dosaggio di IgE, leptina, adiponectina, PCR. Tra i membri dei cluster degli obesi inoltre è stata evidenziata una riduzione nell'espressione dei recettori per i glucocorticoidi ($GCR\alpha$), correlata con una riduzione dell'espressione di MAP chinasi fosfatasi 1 indotta dal desametasone, responsabili di una maggiore resistenza all'azione dei glucocorticoidi. Boudier e coll. hanno invece indagato, mediante uno studio longitudinale, le differenze nella suddivisione in cluster di una popolazione 3320 asmatici, al tempo zero e nel follow-up eseguito a 10 anni dalla prima valutazione [Boudier et al, 2013]. L'analisi dei cluster ha portato al riconoscimento di 7 fenotipi di asma, principalmente caratterizzati dal livello di sintomatologia asmatica (lieve-moderata-severa), dallo stato di atopia e dal tipo di funzionalità respiratoria. I fenotipi osservati a distanza di 10 anni presentavano forte similitudine con quelli ritrovati al tempo zero, o meglio la probabilità di ritrovare un individuo all'interno dello stesso cluster al tempo zero e nel follow-up a 10 anni, variava dal 54 all'88%. La transizione più importante da un cluster all'altro si è visto essere dettata da una variazione negli anni di alcuni asmatici nella sintomatologia, in particolare nei fenotipi comprendenti soggetti non atopici rispetto agli atopici.

Fenotipi dell'asma professionale

Per quanto riguarda nello specifico l'asma professionale gli studi effettuati sono pochissimi. Un recente studio di Sava e coll. [SAVA et al, poster board 205, ATS 2014] ha cercato di identificare, mediante un approccio di analisi dei cluster, i fenotipi più rilevanti all'interno di una popolazione eterogenea di pazienti affetti da asma correlata al lavoro (WRA). Dei 326 soggetti facenti parte del campione, 145 avevano una diagnosi di asma professionale ottenuta mediante esecuzione del test di esposizione specifica (OA). L'analisi dei cluster è stata ottenuta considerando 12 comuni variabili, ovvero: età, sesso, BMI, atopia, rinite, peso molecolare dell'agente, trattamento con corticosteroidi inalatori, PC20 basale, FEV1 basale % del predetto, stato di occupazione al momento della diagnosi, durata dell'esposizione,

abitudine al fumo di sigaretta. L'analisi ha portato ad individuare 3 diversi cluster sia nella WRA che nel sottogruppo dell'OA:

- cluster 1 (WRA): pazienti più anziani, obesi, prevalentemente donne, esposte ad agenti a basso peso molecolare, con una bassa percentuale di atopici ma con un quadro clinico e funzionale peggiore rispetto agli altri 2 cluster;
- cluster 2 (WRA): prevalentemente atopici, maschi, esposti ad agenti ad alto peso molecolare, con una rilevante differenza nella conta della % di eosinofili a livello dello sputum nel pre e post test e per la maggior parte con diagnosi di OA;
- cluster 3 (WRA): pazienti con quadro clinico e funzionale meno grave, solo in parte atopici e senza rinite occupazionale, esposti esclusivamente ad agenti a basso peso molecolare;
- cluster 1 (OA): maschi con una bassa prevalenza di atopia e rinite professionale, sensibilizzati ad agenti a basso peso molecolare e con una reazione al test prevalentemente di tipo ritardato;
- cluster 2 (OA): pazienti più giovani, prevalentemente maschi atopici, sensibilizzati ad agenti ad alto peso molecolare, con un quadro clinico e funzionale meno severo rispetto agli altri cluster, con risposta al test di tipo immediato e con una rilevante differenza nella conta della % di eosinofili a livello dello sputum nel pre e post test ;
- cluster 3 (OA): femmine con quadro più severo e nelle quali l'esposizione all'agente provocava un minore calo medio del FEV1 ed un maggior cambiamento dell'iperreattività bronchiale aspecifica.

Lo studio ha quindi concluso evidenziando come i più importanti elementi di differenziazione tra cluster (ovvero il peso molecolare degli agenti causali, le variazioni nella conta di eosinofili nell'espettorato, l'atopia e il tipo di reazione al test) suggeriscano come, in tale analisi multivariata, i risultati siano determinati da un gruppo di pazienti con reazione immunologica di tipo IgE mediata.

Nel 2014 lo stesso gruppo ricercava mediante l'analisi dei cluster la relazione fra l'atteso incremento di FeNO conseguente al test di provocazione bronchiale specifico (SIC, specific inhalation challenge) ed i fenotipi di asma ottenuti da soggetti che condividessero le medesime caratteristiche cliniche [Lemière et al, 2014].

Su 178 soggetti sottoposti a SIC con svariati sensibilizzanti occupazionali, sia ad alto che a basso peso molecolare (HMW, LMW), 98 risultavano positivi al test. In questo gruppo veniva

condotta l'analisi multivariata dei cluster che riconduceva a tre cluster. Nel Cluster 3, nonostante la positività al SIC, non si riscontrava un incremento significativo di FeNO dopo l'esposizione all'agente professionale scatenante la reazione asmatica. Questi pazienti erano stati esposti esclusivamente ad agenti a basso peso molecolare. Il peso molecolare degli agenti (HMW vs LMW) era l'unico fattore associato con un incremento del FeNO nei soggetti con SIC positivo (OR 4.2 [1.1-16.8]) e si concludeva pertanto che l'incremento di FeNO documentato nei 2 Cluster fosse strettamente associato a reazioni asmatiche indotte da agenti HMW.

Ossido Nitrico

L'ossido nitrico (NO) è una piccola molecola diatomica (30 Da), formata da azoto e ossigeno, legati con legame covalente, reattiva dal punto di vista chimico, essendo di natura radicalica. L'NO diffonde liberamente attraverso le membrane e i compartimenti cellulari, con solubilità e diffusibilità simili a quelle dell'ossigeno [Maniscalco et al, 2004; Butler et al, 1995; Stamler, 1994]. L'NO viene prodotto da numerose cellule ed è sintetizzato dall'amminoacido L-arginina, per azione della NO sintetasi (NOS) che converte la L-arginina a NO e L-citrullina, con produzione intermedia di N-idrossi-L-arginina. La reazione richiede ossigeno e NADPH che interviene come donatore di elettroni, con formazione di NADP.

Si possono distinguere tre isoforme di NOS: endoteliale (eNOS), neuronale (nNOS) e inducibile (iNOS). Le forme eNOS e nNOS sono definite costitutive (cNOS) in quanto sono espresse in risposta a stimoli fisiologici; iNOS invece non è normalmente espressa, ma viene indotta in seguito a specifici stimoli di tipo infiammatorio/immunitario, quali citochine (ad es. IL-1, TNF α , INF γ), o lipopolisaccaridi di origine batterica [Bjerner et al, 2014; Kleinert et al, 2000].

Meccanismo d'azione dell'ossido nitrico

A differenza delle altre molecole segnale, l'NO è privo di uno specifico recettore che ne moduli l'azione; essendo allo stato gassoso diffonde liberamente attraverso le membrane cellulari e si lega direttamente ai suoi substrati.

L'NO può agire con un meccanismo diretto o indiretto: può legarsi direttamente a molti enzimi, in particolare la guanilato-ciclasa, determinando la produzione di cGMP, che è responsabile degli effetti biologici o, mediante un meccanismo indiretto, può reagire con altre molecole, quali l'ossigeno o l'anione superossido (O_2^-), per formare composti reattivi

dell'ossigeno (ROS). I composti ROS sono molto reattivi e instabili e reagiscono rapidamente con i composti tiolici presenti nelle cellule, quali proteine, cisteina e glutathione. In presenza di stress ossidativo l'NO interagisce con l'anione superossido (O_2^-), con produzione dell'anione perossinitrito ($ONOO^-$), ancora più reattivo e tossico per la cellula [Coleman, 2002; Grisham et al, 1999; Miranda et al, 2000].

Le funzioni dell'ossido nitrico

L'NO agisce con numerose funzioni, sia a livello cardiovascolare, che polmonare che sistemico. A livello cardiovascolare, l'NO prodotto dalle cellule endoteliali vasali, agendo sulla muscolatura liscia vasale, mediante l'attivazione della guanilato-ciclasa e la produzione di cGMP, può determinare vasodilatazione, sia venosa, sia arteriosa, sia a livello del microcircolo [Zoritech, 1995, Barnes et al, 1993, Calver et al, 1993]. Inoltre può inibire l'ossidazione delle LDL e l'aggregazione piastrinica, con effetto antiaterosclerotico.

A livello polmonare sono espresse tutte e tre le isoforme di NOS [Kobzik et al, 1993; Asano et al, 1994]; sebbene l'espressione di iNOS sia indotta in seguito a processi infiammatori, sembra che una minima quota basale di iNOS sia espressa nell'epitelio delle vie aeree dei soggetti sani [Saleh et al, 1998]. Ciò potrebbe essere conseguenza della continua inalazione di inquinanti respiratori che agiscono da stimolo irritativo e inducono l'espressione di iNOS [Guo et al, 1995].

L'ossido nitrico potrebbe agire anche come neurotrasmettitore del sistema non-adrenergico-non-colinergico (NANC), con effetto broncodilatatorio sulle vie aeree, sia centrali, sia periferiche. Il sistema NANC innerva i vasi bronchiali, il muscolo liscio della parete bronchiale e le ghiandole della sottomucosa, ed è l'unico sistema nervoso con funzione vasodilatatoria nelle vie aeree [Zoritech, 1995, Belvisi et al, 1992].

L'elevata produzione di NO sembra avere un ruolo nella patogenesi dell'asma. L'ossido nitrico partecipa alla regolazione del rapporto Th1/Th2 dei linfociti, poiché inibisce il rilascio di IL-2 e $IFN\gamma$ da parte dei linfociti Th1, ma non ha effetto sulle citochine prodotte dai Th2 [Taylor-Robinson et al, 1992]. L'NO potrebbe quindi favorire la risposta Th2 e favorire l'insorgenza dell'asma, essendo questa una patologia mediata, come altre patologie su base allergica, soprattutto dai linfociti Th2.

L'NO prodotto da cNOS in condizioni basali nelle cellule epiteliali bronchiali avrebbe un effetto inibitorio sulla broncoostruzione indotta dalla istamina. Nell'asma, le alte

concentrazioni di NO prodotte da iNOS potrebbero causare una down-regulation di cNOS, alterando il meccanismo che previene la broncoostruzione.

L'NO ha inoltre un ruolo come mediatore nei processi infiammatori: in seguito all'esposizione alle citochine infiammatorie, in particolare $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IL-1, si ha l'espressione di iNOS nei macrofagi; l'NO prodotto contribuisce al loro effetto citotossico mediante la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), soprattutto perossinitrito e N_2O_3 che si formano dalla reazione tra NO e anione superossido (O_2^-) [Zoritech, 1995].

L'NO può modulare la risposta infiammatoria anche modificando l'attività di altri mediatori: ad esempio riduce la sintesi dei leucotrieni inibendo la 5-lipoossigenasi [Moilanen et al, 1993; Brunn et al, 1997].

La misura dell'ossido nitrico esalato

La presenza di NO endogeno nell'aria esalata è stata identificata per la prima volta nel 1991 [Gustaffson et al, 1991]. I primi studi in vivo su soggetti asmatici hanno mostrato come la concentrazione di ossido nitrico esalato (FeNO) sia aumentata nei soggetti con asma rispetto ai sani [Kharitonov et al, 1994; Kharitonov et al, 1995; Massaro et al, 1995]. La quota di NO nell'aria esalata è principalmente prodotta da iNOS e non da cNOS [Lane et al, 2004]: in particolare, si è evidenziato che nelle cellule epiteliali bronchiali di soggetti atopici e asmatici, ottenute mediante brushing, l'mRNA di iNOS è contenuto in notevoli quantità, quello di eNOS in quantità minime e quello di nNOS non è presente; inoltre è presente una relazione statisticamente significativa tra FeNO e l'espressione di iNOS [Lane et al, 2004].

Dopo la standardizzazione della metodica da parte dell'American Thoracic Society (ATS) nel 1999, aggiornata poi nel 2005 e nel 2011 [Dweik et al, 2011], la misura dell'NO esalato è diventata uno dei più importanti strumenti per la diagnosi di asma bronchiale e per la valutazione dell'infiammazione eosinofila delle vie aeree [Corradi et al, 2011]. Inoltre, essendo un mezzo non invasivo e di semplice esecuzione risulta preferibile a tale scopo, rispetto ad altre metodiche invasive o semi-invasive, quali la broncoscopia (con lavaggio o biopsia) e l'induzione dello sputo, rispettivamente. La misura dell'NO esalato può facilmente essere impiegata in ambito ambulatoriale e può essere utilizzata anche direttamente in azienda nel corso della sorveglianza sanitaria dei lavoratori asmatici mediante dispositivi portatili.

Strumentazione

Le apparecchiature utilizzate per la misura dell'ossido nitrico esalato sfruttano il principio della chemiluminescenza (emissione di radiazione elettromagnetica che può accompagnare una reazione chimica): esso è basato sulla reazione tra NO e l'ozono (O₃), che è prodotto da un generatore di ozono contenuto nello strumento; NO e O₃ formano diossido di azoto allo stato eccitato (NO₂^{*}). Quest'ultimo decade allo stato non eccitato (NO₂) non con emissione di calore, ma di un fotone ($h\nu$) [Lundberg et al, 1994]. La reazione è la seguente:



La chemiluminescenza è misurata da un fotomoltiplicatore che converte l'intensità della luminescenza in segnale elettrico, con visualizzazione su display. La quantità di luce emessa è proporzionale alla quantità di NO presente nell'aria esalata. La chemiluminescenza è una tecnica molto sensibile: l'ossido nitrico presente può essere misurato fino alla una concentrazione estremamente bassa di 1 ppb [Lundberg et al, 1994; Archer, 1993].

Il sistema portatile è invece basato su un sensore elettrochimico, non a chemiluminescenza (NIOX MINO, Aerocrine); i valori di FeNO ottenuti utilizzando il sistema portatile hanno una buona correlazione con quelli misurati con il sistema a chemiluminescenza [Menzies et al, 2007].

Metodologia

La metodica "standard" di misurazione può essere di due tipi: on-line ed off-line. La tecnica più utilizzata è quella on-line: essa permette di determinare la concentrazione di NO esalato (FeNO) direttamente, visualizzando in tempo reale, attraverso un display, il profilo della concentrazione di NO esalato, che consiste di un picco iniziale, seguito da un plateau. Il FeNO viene fornito automaticamente dallo strumento di misurazione, e viene calcolato sulla base della concentrazione di NO al momento del plateau, che deve avere una durata di almeno 3 secondi. La misurazione viene effettuata durante una singola manovra di esalazione a flusso d'aria costante di 50 ml/sec, mantenuto attraverso un limitatore di flusso. La metodica off-line, molto meno utilizzata, prevede invece che l'aria esalata venga raccolta in un contenitore specifico e solo successivamente misurata.

La standardizzazione della tecnica di misura dell'NO esalato ha permesso di ovviare a due problemi: l'influenza dell'NO ambientale e la possibile contaminazione del FeNO misurato con l'NO prodotto a livello nasale. L'influenza dell'NO ambientale viene esclusa facendo in modo che il soggetto inspiri non l'aria ambientale, ma quella contenuta nello strumento utilizzato per la misura, priva di una quota significativa di NO (inferiore a 5 ppb). L'influenza dell'NO nasale viene eliminata applicando una pressione durante l'esprio, variabile tra 5 e 20 cmH₂O, in modo che il soggetto espiri contro resistenza ed in modo che si abbia la chiusura del velopalatino; ciò permette di separare l'NO nasale da quello proveniente dalle basse vie aeree [ATS/ERS, 2005].

Prima del 2011, i valori di riferimento per adulti sani, non fumatori, ottenuti a flusso espiratorio di 50 ml/sec, erano compresi nel range 4.5-20.6 ppb per i maschi, 3.6-18.2 ppb per le femmine [Olivieri et al, 2006]. In uno studio del 2007 veniva anche fornito il FeNO medio distinto per sesso, range di età, intervalli di altezza e stato di atopia o meno [Olin et al, 2007]. Con l'aggiornamento del 2011, le raccomandazioni sono: per valori di FeNO inferiori a 25 ppb l'infiammazione eosinofila è poco probabile; valori superiori a 50 ppb indicano la presenza di una rilevante infiammazione eosinofila; per valori tra 25 e 50 ppb l'interpretazione del risultato va considerata in relazione al contesto clinico (se il test viene usato per la diagnosi in un paziente "steroid-naive" oppure se si tratta di un controllo in paziente già in terapia; in questo caso il valore misurato si considera in relazione ad un aumento o a una diminuzione rispetto alla precedente misura [Dweik et al, 2011].

Procedura

Secondo le disposizioni ATS del 2005, la procedura di misurazione è la seguente:

1. dopo aver spiegato il modo chiaro e preciso la metodica, far sedere il soggetto in modo che si trovi in una posizione confortevole;
2. non è consigliato l'uso dello stringinaso come nella spirometria, in quanto l'applicazione di una pressione tra 5 e 20 cmH₂O durante l'espirazione, come precedentemente spiegato, permette la chiusura del velopalatino, separando l'NO nasale da quello prodotto nelle basse vie aeree; ci sono evidenze che l'uso dello stringinaso sarebbe addirittura controindicato in quanto esso fa sì che l'NO nasale si accumuli e possa alterare la misura dell'NO proveniente dalle basse vie aeree attraverso il passaggio nel nasofaringe;
3. evitare di trattenere il respiro prima della misura perché FeNO potrebbe risultare falsamente elevata a causa dell'accumulo di NO durante il trattenimento del respiro;

4. espirare fino al volume residuo (VR) senza boccaglio;
5. posizionare il boccaglio e inspirare per 2-3 secondi fino al raggiungimento della capacità polmonare totale (CPT);
6. esalare attraverso il boccaglio mantenendo un flusso d'aria costante a 50 ml/sec($\pm 10\%$), indicato da una freccia che deve essere mantenuta nella tacca verde; la durata dell'espirazione è di 8 sec;
7. terminata l'esalazione, ripetere per altre tre volte, a distanza di almeno 30 secondi l'una dall'altra, ed effettuare la media aritmetica delle tre misure.

Per assicurare la validità della misura è necessario che il flusso medio durante il test si mantenga tra 45 e 55 ml/s; il valore di FeNO nella fase di plateau non deve modificarsi di più del 10% (2,5 ppb) [Kaiser et al, 2008]; non ci devono essere perdite d'aria ai lati del boccaglio, altrimenti si determina una sottostima del valore di FeNO misurato.

Applicazione clinica in medicina del lavoro

Poiché la misura dell'NO esalato risulta essere una valida e non invasiva metodica di misurazione diretta dell'entità dell'infiammazione delle vie aeree, oltre che di facile esecuzione, il suo impiego nella pratica clinica può essere molto ampio. L'asma rappresenta la condizione patologica per la quale l'applicazione della misura dell'NO esalato è stata maggiormente studiata: l'NO viene ampiamente prodotto durante i processi infiammatori delle vie aeree, in particolare nell'asma bronchiale [Thomassen et al, 2001; Barnes 1995, 1996; Kharitonov et al, 2000].

Attualmente, anche se la misura dell'NO esalato è rapida, non invasiva e di facile esecuzione, risulta poco applicata in ambito occupazionale nonostante l'evidente utilità che potrebbe fornire. Nel caso del test di stimolazione bronchiale specifico con agenti occupazionali (SIC) è stato rilevato che i soggetti con SIC positivo hanno valori di FeNO più elevati dei soggetti con SIC negativo [Lemière, 2007; Piipari et al, 2002]. Come precedentemente segnalato l'incremento del FeNO a seguito del SIC sarebbe maggiore per gli agenti ad alto peso molecolare [Lemière et al, 2014]; in particolare l'incremento di 12 ppb di FeNO in soggetti esposti a SIC con agenti ad alto peso molecolare avrebbe un elevato valore predittivo positivo per la positività del test [Pedrosa et al, 2012]. Per un incremento del FeNO post challenge specifico con agenti ad alto peso molecolare del 21% il valore predittivo positivo (VPP) per un SIC positivo è del 88.9% [Sastre et al, 2013]. Tale incremento è maggiore a 24 ore dal test [Pedrosa et al, 2012].

Sastre et al. hanno invece rilevato un incremento significativo del FeNO in seguito a SIC con agenti a basso peso molecolare [Sastre et al, 2013]. Mentre non si sono evidenziate variazioni significative del FeNO a seguito del SIC con persolfati [Corradi et al, 2008] e cedro rosso [Obata et al, 1999], per quanto riguarda gli isocianati, sembra maggiormente concorde il riscontro di un incremento del FeNO a seguito del SIC [Barbinova et al, 2006; Jonaid et al, 2014; Lemièrè, 2007; Piipari et al, 2002]; il FeNO raddoppia dopo SIC nel 67% dei positivi al test; l'incremento del FeNO risulta massimale a 24-48 ore dal test. Inoltre, il valore di FeNO misurato pre e post SIC correla con l'eosinofilia nell'espettorato, confermando che FeNO riflette il grado di eosinofilia delle vie aeree, che aumenta a seguito del test specifico [Barbinova et al, 2006; Ferrazzoni et al, 2009; Swierczyńska-Machura et al, 2008]. Per un incremento del FeNO post challenge specifico con agenti a basso peso molecolare del 41% il valore predittivo positivo (VPP) per un SIC positivo è del 100% [Sastre et al, 2013].

E' stato inoltre evidenziato un incremento del FeNO in seguito all'esposizione ad agenti irritanti: toluene, xilene e metilchetone in operai in calzaturificio [Maniscalco et al, 2004; Lemièrè, 2007] o polveri e gas in ambiente confinato [Lemièrè, 2007; Ulvestad et al, 2001]. Non sembrerebbe esserci un incremento del FeNO in seguito all'esposizione a particolato [Corradi et al, 2011].

Anche nel caso dell'asma da granaglie, è stato riscontrato un incremento del FeNO in agricoltori e addetti negli allevamenti di suini, probabilmente in relazione alle endotossine [Corradi et al, 2011; Von Essen et al, 1998; Sundblad et al, 2002]. La misurazione dell'NO esalato da sola non sembra comunque avere una sufficiente sensibilità e specificità per essere utilizzato come test di screening per asma occupazionale; secondo alcuni autori il riscontro di un incremento del FeNO non è sufficientemente predittivo di un SIC positivo [Walters et al, 2014]. Tuttavia, in una popolazione a rischio selezionata, per esempio mediante dei questionari standardizzati, potrebbe rappresentare una valida applicazione, per aumentare il valore predittivo positivo degli stessi [Florentin et al, 2014; Merget et al, 2015]. In particolare nel sospetto di asma occupazionale da isocianati c'è evidenza che il FeNO sia un valido metodo di valutazione dell'infiammazione e di monitoraggio della malattia; la determinazione del FeNO in associazione con l'esecuzione del test di stimolazione bronchiale aspecifico con metacolina è un valido approccio per identificare i soggetti a rischio [Corradi et al, 2011]. Inoltre, quando utilizzato in associazione al SIC, può essere di valido aiuto nell'interpretazione dell'esito del test, soprattutto nei casi borderline [ATS/ERS, 2005; Corradi et al, 2011; Swierczynska-Machura et al, 2005].

Limiti della misura dell'NO esalato

Un importante limite della misura “standard” è che FeNO risulta essere strettamente dipendente dall'entità del flusso espiratorio: maggiore è il flusso d'aria espiratorio (che comporta una durata minore dell'esalazione) minore è il FeNO, e viceversa. La relazione tra FeNO e il flusso espiratorio è illustrata in figura 7.

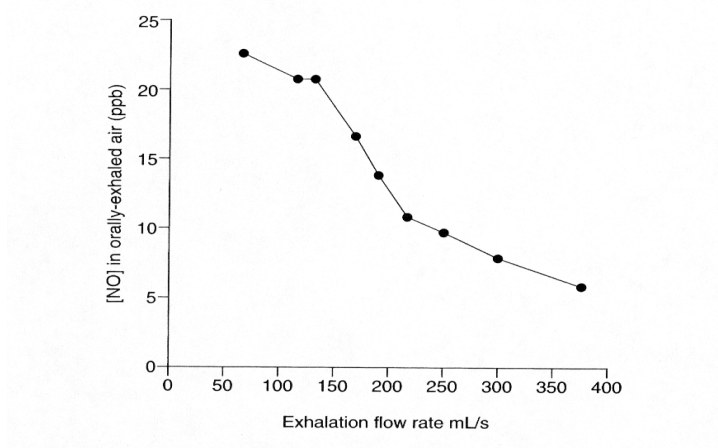


Fig. 7: Relazione tra il flusso espiratorio e la concentrazione di NO esalato.

La stretta dipendenza del FeNO dall'entità del flusso espiratorio (flow-dependence), è dovuta ai processi di diffusione dell'NO dalla parete delle vie aeree al lume; a flussi elevati, poichè il tempo di transito del gas alveolare nelle vie aeree è più ridotto, la quota di NO prodotto a livello dell'epitelio bronchiale, che diffonde nel lume, sarà minore, con conseguente minore FeNO [Lundberg et al, 1996; ATS/ERS 2005; Silkoff et al, 1997; Högman et al, 1997].

Oltre a ciò, un altro importante limite della misura dell'NO esalato è rappresentato dall'effetto incerto della broncoostruzione sulla misura: De Gouw e al. hanno per primi dimostrato che in presenza di broncoostruzione acuta il valore di FeNO è ridotto [De Gouw e al, 1998]; successivi studi hanno confermato tale effetto [Mitsufuji et al, 2001; Ho et al, 2000]. Il meccanismo per cui il valore di FeNO è ridotto in caso di broncocostrizione non è ben chiarito; De Gouw e al. hanno studiato l'effetto della broncoostruzione indotta in modo diretto (con istamina o metacolina) o indiretto (soluzione salina ipertonica) e hanno concluso che la riduzione di FeNO è dovuta al grado di ostruzione delle vie aeree, e che quindi il valore di FeNO può essere modificato dai cambiamenti del calibro delle vie aeree. Una possibile spiegazione del fenomeno è che la broncoostruzione si associa a mismatch ventilo-perfusorio con creazione di shunt intrapolmonare; possiamo quindi ipotizzare che la riduzione di FeNO

osservata possa essere dovuta alle regioni polmonari con alterato rapporto ventilazione-perfusione, causato dalla locale ostruzione delle vie aeree periferiche: l'NO prodotto nelle vie aeree ipoventilate rimarrebbe intrappolato nei bronchi e non verrebbe esalato; la mancanza di correlazione tra il calo di FeNO e di FEV1 potrebbe essere dovuta ad una maldistribuzione della ventilazione [Piacentini et al, 2002].

Un'altra possibile spiegazione riguardo la riduzione del FeNO in caso di broncoostruzione è il rallentato flusso espiratorio locale nelle vie aeree più costrette, dove la concentrazione di NO risulta quindi più alta; le regioni polmonari non broncoostruite dove il flusso è più veloce contribuiscono maggiormente al bolo espirato, diluendo la concentrazione di NO. Ne risulta una concentrazione di FeNO più bassa [Mitsufuji et al, 2001].

E' stato inoltre verificato che la successiva somministrazione di 400 µg di Salbutamolo, determina invece un rapido aumento del valore di FeNO di circa il 10%, effetto che ha una durata di circa un'ora dalla somministrazione [Silkoff et al, 1999; Mitsufuji et al, 2001; De Gouw et al, 1998]; FeNO può aumentare fino al 30%, con picco massimo a nove ore dalla somministrazione [Boot et al, 2005]. Il rapido aumento di FeNO può far ipotizzare un effetto meccanico: se la sintesi di NO aumenta in seguito ad un processo infiammatorio che si associa a broncoostruzione, ma poi l'NO rimane all'interno delle vie aeree ostruite, il ripristino della pervietà delle vie aeree permetterà all'NO prodotto di fuoriuscire con l'aria esalata [Silkoff et al, 1999]. L'aumento di FeNO potrebbe essere dovuto anche ad un aumento dell'area di superficie della mucosa bronchiale, aumentando la quota di NO che diffonde nelle vie aeree [Mitsufuji et al, 2001]. Quest'ultima ipotesi rimane comunque dubbia poiché è stato dimostrato che l'area di superficie della mucosa bronchiale rimane costante a differenti gradi di broncodilatazione [Wiggs et al, 1992].

Secondo Ho, la riduzione di FeNO in seguito a broncoostruzione potrebbe essere attribuita ad un artefatto, cioè ad un aumento della velocità del flusso d'aria esalato nelle vie aeree costrette, quando il flusso esalato alla bocca è mantenuto costante. Quando la velocità del flusso espiratorio è aumentata, il tempo di residenza dell'aria nelle vie aeree è minore, e il tempo affinché l'NO prodotto a livello della parete bronchiale diffonda nel lume è limitato; ne deriva un valore di FeNO più basso [Ho et al, 2000].

Al contrario, in un altro studio è stato evidenziato che né la broncoostruzione indotta da metacolina, né la broncodilatazione ottenuta con somministrazione di Salbutamolo, determinano un cambiamento significativo della produzione di NO [Garnier et al, 1996].

Un ulteriore importante limite della misura dell'NO esalato "standard" è che il valore di FeNO con una singola manovra a flusso d'aria espiratorio controllato a 50 ml/sec, come

suggerito dall'ATS, non è specifico riguardo alla sede di produzione dell'NO; l'NO prodotto deriva infatti in parte da una produzione bronchiale e in parte da una produzione alveolare. Di conseguenza, il valore di FeNO di due soggetti, ottenuto con la metodica standard, potrebbe essere potenzialmente la stessa, pur in presenza di un differente contributo da parte delle vie aeree e degli alveoli polmonari: due soggetti, uno con asma e uno con polmonite da ipersensibilità, mostreranno entrambi un FeNO aumentato, ma mentre nell'asma l'NO deriva in gran parte dalla regione bronchiale, viceversa, nel caso della polmonite da ipersensibilità, la maggiore produzione di NO sarà a livello alveolare [Tsoukias et al, 1998, 2001; Högman et al, 2000].

L'ossido nitrico esalato frazionato

Per ovviare a questo problema è stata sviluppata la tecnica "single-breath": utilizzando manovre multiple di esalazione singole a differenti flussi d'aria espiratoria costanti, risulta possibile determinare separatamente il contributo bronchiale e alveolare alla produzione di NO, mediante la stima di parametri che caratterizzano le due regioni [Tsoukias et al, 1998, 2001; Högman et al, 2000].

La regione alveolare viene stimata mediante un solo parametro: la concentrazione di NO alveolare (CaNO); la regione bronchiale viene invece valutata mediante tre parametri: il flusso di NO a livello bronchiale (JawNO), la concentrazione di NO a livello della parete bronchiale (CawNO) e la diffusione di NO all'interfaccia lume-parete bronchiale (DawNO) [Brindicci et al, 2007; Högman et al, 2000; Roy et al, 2007; Tsoukias et al, 1998, 2001]. I suddetti parametri sono definiti "flow-independent" perché, a differenza del FeNO, non dipendono dall'entità del flusso d'aria espiratorio. Questa indipendenza dal flusso è importante in quanto non solo rende possibile confrontare i valori dei parametri ottenuti mediante diversi metodi di determinazione, ma soprattutto permette di avere delle informazioni dotate di maggior accuratezza e più esplicative rispetto al valore di FeNO singolo.

Modelli della dinamica dell'NO a livello polmonare

Una volta identificato che l'NO viene prodotto non solo nella regione alveolare ma anche in quella alveolare [Silkoff et al, 1997; Högman et al, 1997], è stato proposto il cosiddetto

modello bi-compartmentale, definito tale in quanto prende in considerazione sia la regione bronchiale che quella alveolare [Tsoukias et al, 1998; 2001] (fig. 8).

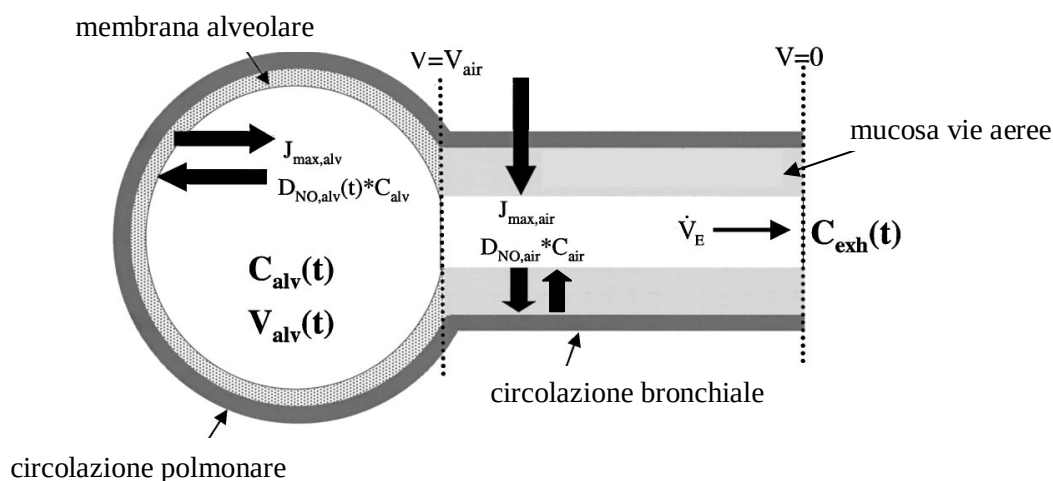


Fig 8: Il modello bi-compartmentale proposto da Tsoukias e al. (spiegazione nel testo).

Il modello è costituito da un compartimento rigido, di forma cilindrica, che rappresenta le vie aeree (escluse le vie aeree distali), e da un compartimento espansibile che rappresenta i bronchioli respiratori e gli alveoli polmonari. Entrambi i compartimenti sono rivestiti da uno strato di tessuto che rappresenta, rispettivamente, la mucosa bronchiale e la membrana alveolare, capaci di produrre e consumare NO. Si assume inoltre che lo strato di tessuto in entrambi i compartimenti sia irrorato rispettivamente dalla circolazione bronchiale e polmonare. L'NO prodotto nello strato tissutale può: 1) essere utilizzato all'interno dei tessuti nelle reazioni con numerosi substrati quali ossigeno, anione superossido (O_2^-), metalloproteinasi, 2) diffondere nella circolazione bronchiale o polmonare, dove si lega rapidamente all'emoglobina con elevata affinità, 3) diffondere nel lume (bronchiale o alveolare). Viene assunto che nelle vie aeree sia prodotta una quota di NO costante per unità di volume e quindi che il flusso di NO nelle vie aeree (J_{awNO}) sia costante. Si assume inoltre che il trasporto dell'NO nelle vie aeree avvenga solo per convezione e viene considerata irrilevante la diffusione assiale (moto browniano delle molecole); questo permette di applicare delle formule matematiche più semplici per la stima dei parametri "flow-independent".

Nel compartimento bronchiale si ha che:

$$J_{awNO} = D_{awNO} \times (C_{awNO} - C_{aNO}) = D_{awNO} \times C_{awNO}, \text{ se } C_{aNO} = 0$$

dove J_{awNO} è il flusso netto di NO tra la mucosa bronchiale e la via aerea, D_{awNO} è la diffusione dell'NO attraverso la parete; $(C_{awNO} - C_{aNO})$ è indicata nella fig. 5 come C_{air} .

J_{awNO} è regolato dalla legge di diffusione di Fick:

$$\text{velocità diff} = d A \Delta c$$

Secondo tale principio la velocità di diffusione è direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione (Δc) tra tessuto e lume, o tra tessuto e circolazione bronchiale, all'area di superficie (A) in cui avviene la diffusione e al coefficiente di diffusione dell'NO (d). La direzione del flusso di NO dipende dalle concentrazioni relative di NO nella mucosa bronchiale e nel lume delle vie aeree.

Nel compartimento alveolare la distribuzione di NO è uniforme: l'NO nell'aria alveolare può sia fuoriuscire con l'aria esalata, sia diffondere nella circolazione polmonare, dove si lega rapidamente all'emoglobina con elevata affinità; viene rapidamente raggiunto l'equilibrio tra NO presente nello strato tissutale ed NO che diffonde nel lume alveolare. Si ha quindi un flusso di NO attraverso la membrana alveolare (J_{alv}) sia verso il lume, sia verso la circolazione polmonare, regolato come nel compartimento bronchiale dalla legge di diffusione di Fick; l'NO che passa nel lume entra a far parte del volume alveolare (V_{alv}) e determina una data concentrazione alveolare.

Nell'esprio, la quota di NO alveolare passa nel compartimento bronchiale ed entra a far parte del volume delle vie aeree (V_e); se l'aria espirata rimane nel compartimento bronchiale per un tempo sufficiente, si avrà diffusione di NO dalla mucosa bronchiale al lume; la concentrazione finale di NO esalata dipenderà quindi sia dalla produzione di NO e dalle dinamiche dell'NO a livello alveolare, sia dall'NO prodotto a livello bronchiale, che si mescola con quello alveolare diffondendo nel lume delle vie aeree [Tsoukias et al, 1998; 2001].

In studi più recenti questo modello viene messo in discussione ed è stato proposto il "trumpet model", ovvero modello a tromba, che si differenzia rispetto al modello cilindrico bi-compartimentale poiché considera l'area di superficie a contatto con il lume maggiore via via che ci si sposta verso vie aeree più piccole (fig. 9) [Verbanck et al, 2008; Kerckx et al, 2009; Gelb et al, 2010; Condorelli et al, 2002 e 2007]. Quindi il volume del parenchima polmonare non ha sempre la stessa area di superficie bensì questa aumenta tanto più ci si avvicina al compartimento alveolare.

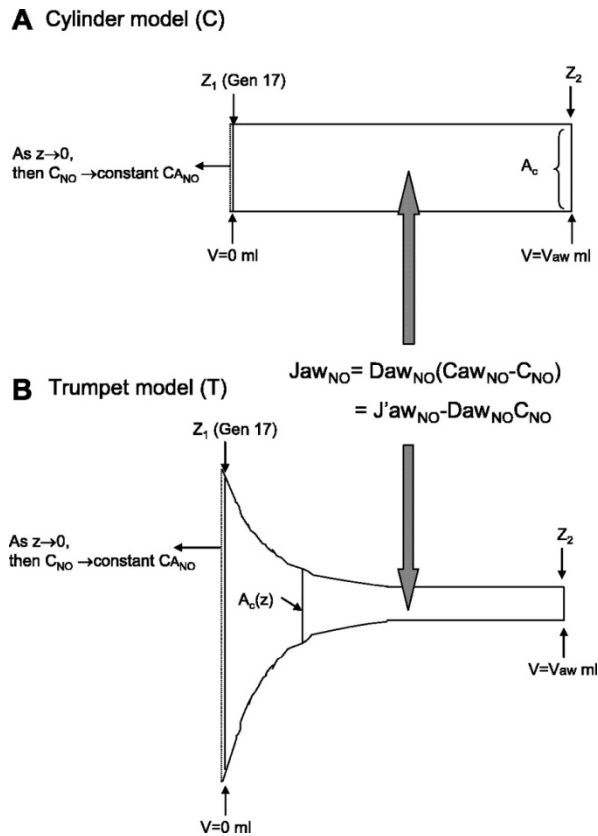


Fig. 9: Confronto tra modello cilindrico e modello a tromba (spiegazione nel testo).

L'ultimo modello proposto, che sembra essere quello che si avvicina di più alla realtà della fisiopatologia respiratoria è il cosiddetto TMAD (trumpet shape of the airway tree and axial diffusion), proposto da Condorelli, che si basa sul modello a tromba ma considerando come rilevante la back-diffusion dell'NO dal compartimento bronchiale a quello alveolare. Il fenomeno consiste nel fatto che quando la concentrazione di NO all'interno delle vie aeree è elevata, si verifica una retrodiffusione dell'NO verso il compartimento alveolare, determinando quindi un incremento della concentrazione alveolare di NO che non è dovuta all'effettiva produzione di NO nel suddetto compartimento ma alla diffusione retrograda di quello prodotto nel compartimento bronchiale. Utilizzando soluzioni di aria contenente elio è stato quindi dimostrato come, considerando la back-diffusion, si verifichi una riduzione di J_{awNO} e un aumento di C_{aNO} .

Il riscontro di un C_{aNO} diverso da zero potrebbe essere dovuto anche interamente alla back-diffusion [Condorelli et al, 2002 e 2007].

Anche il modello a tromba è una semplificazione rispetto alla reale dinamica del flusso d'aria nelle vie aeree. Ad esempio si assume che J_{awNO} sia costante per unità di volume, quando invece diminuisce per l'area di superficie [Shin et al, 2004]; l'errore derivato è minimo poiché

la componente alveolare, compartimento in cui questo fenomeno risulta più evidente, produce una percentuale inferiore al 15% del'NO esalato [Verbank et al, 2008; Kerckx et al, 2009; Gelb et al, 2010; Shin et al, 2004]. Inoltre non viene presa in considerazione la possibile asimmetria delle vie aeree e la non omogenea ventilazione [Van Muylem et al, 2003].

Procedura della tecnica “single-breath”

La tecnica “single-breath” si avvale di manovre multiple di esalazione singole a differenti flussi d'aria espiratoria costanti: si intende cioè che il paziente esali con la stessa procedura della misurazione standard, ma invece che ad un flusso espiratorio costante di 50 ml/sec soltanto, a più flussi espiratori costanti; la manovra è facilitata dall'utilizzo di più limitatori di flusso come per la metodica standard.

In teoria, l'esalazione a numerosi flussi espiratori costanti diversi permetterebbe una stima il più precisa possibile dei parametri “flow-independent”, ma ciò è ovviamente impossibile da effettuare in pratica, sia per quanto riguarda il tempo richiesto per l'esecuzione, sia soprattutto per l'entità dell'impegno a cui i pazienti verrebbero sottoposti.

Il numero e l'entità dei flussi espiratori costanti utilizzati varia essenzialmente con il tipo di strumentazione utilizzata: Tsoukias e al. hanno utilizzato flussi espiratori tra 100 e 500 ml/sec; Högman e al. ne hanno usato tre: uno ad alto flusso (>300 ml/sec), uno a flusso intermedio (100 ml/sec) e uno a basso flusso (10 ml/sec); anche Lehtimäki e al. ne hanno utilizzati tre, ma da 100, 175, 370 ml/sec; Brindicci e al. cinque, da 10, 50, 100, 200, 300 ml/sec; Roy e al. cinque, da 10, 30, 50, 100, 200 ml/sec.

Il numero e l'entità dei flussi espiratori utilizzati è estremamente importante in quanto la validità della stima dei parametri “flow-independent” ne è strettamente dipendente; secondo Högman ne sono necessari almeno tre, non essendoci differenza tra i valori di CawNO e DawNO calcolati con undici o tre flussi [Högman et al, 2002; Högman et al, 2000]; secondo Roy la stima è più accurata usandone cinque [Roy et al, 2007].

Indipendentemente dal numero e dall'entità dei flussi espiratori utilizzati, l'importante è che vengano utilizzati flussi sufficientemente alti per permettere un buon campionamento del compartimento alveolare, e flussi sufficientemente bassi per permettere invece il campionamento del compartimento bronchiale. Infatti ad alti flussi (almeno di 200 ml/sec) la durata dell'esalazione è piuttosto limitata; di conseguenza il tempo in cui l'aria alveolare rimane all'interno delle vie aeree limita la diffusione dell'NO prodotto a livello della mucosa bronchiale nel lume; pertanto la concentrazione di NO esalata ad alti flussi espiratori permette

di avere informazioni prevalentemente sulla regione alveolare (FeNO approssima pertanto CaNO). A flussi bassi, la durata dell'esalazione è più lunga; l'aria proveniente dagli alveoli polmonari rimane quindi all'interno delle vie aeree per un tempo sufficiente per permettere la diffusione dell'NO dalla mucosa bronchiale al lume; per flussi espiratori molto bassi FeNO deriva quasi esclusivamente dal compartimento bronchiale.

La procedura con cui viene effettuata la misurazione non differisce dalla metodica standard.

Per ogni flusso espiratorio si effettuano tre misure e di queste si calcola la media aritmetica, per ottenere un valore di FeNO per ciascun flusso; data la dipendenza di FeNO dal flusso esalato, si hanno valori più alti per i bassi flussi e valori più bassi per gli alti flussi. Sulla base dei valori di FeNO si effettuano poi dei complessi calcoli matematici per poter stimare JawNO, CawNO, DawNO, CaNO.

Un importante limite della metodica è che richiede da parte del paziente uno sforzo espiratorio elevato, e una buona compliance durante l'esecuzione, soprattutto per i flussi espiratori bassi, caratterizzati da una maggiore durata di esalazione (20 sec); di conseguenza il test può essere di difficile attuazione nei pazienti con funzionalità respiratoria compromessa [Tsoukias et al, 1998; 2001].

Metodi lineare e non lineare per la determinazione dei parametri flow-independent

I parametri flow-independent possono essere stimati mediante due metodi: il metodo lineare, proposto da Tsoukias [Tsoukias et al, 1998; 2001], e il metodo non lineare, proposto da Högman e Meriläinen [Högman et al, 2000; 2002; 2007]. Sia il metodo lineare, sia quello non lineare sono basati sul modello bicompartimentale, e utilizzano delle complesse equazioni matematiche di calcolo differenziale per calcolare i parametri flow-independent.

Il metodo lineare utilizza delle formule estremamente complicate, di cui, per sintesi, si riportano quelle più rilevanti. Esso è formulato sulla base della seguente assunzione: l'accumulo di NO che passa dalla parete bronchiale al lume, mentre attraversa le vie aeree, può essere schematizzato dividendo le vie aeree in piccolissime e infinite unità; quando l'aria entra nel compartimento bronchiale la concentrazione di NO nel compartimento bronchiale è uguale alla concentrazione alveolare; nella prima unità l'NO diffonde dalla parete bronchiale al lume, e quando entra nella seconda unità la concentrazione di NO nel lume è uguale alla somma della concentrazione alveolare e dell'NO che diffonde nella prima unità. Quando si

passa nella terza unità, la concentrazione di NO nel lume è uguale alla concentrazione alveolare + l'NO che diffonde nelle prime due unità, e così via.

La concentrazione di NO finale nell'aria esalata (FeNO) risulta:

$$\text{FeNO}(t + \tau_{\text{res}}) = \left[\text{CaNO}(t) - \text{JawNO}/\text{DawNO} \right]^{-\text{DawNO}/\text{Ve}} + \text{JawNO}/\text{DawNO} \quad (1)$$

dove t è un tempo x , τ_{res} è il tempo di residenza dell'NO nel compartimento bronchiale formato dalle diverse infinite unità, ed è dato dal rapporto tra il volume del compartimento bronchiale e il flusso d'aria nelle vie aeree (Ve).

La produzione di NO totale (VNO) è uguale al prodotto di FeNO e del flusso d'aria espiratorio (Ve); viene applicata la metodica dei minimi quadrati per ottenere la retta di regressione lineare tra VNO e Ve .

L'equazione matematica di una retta è $y = ax + b$; si ottiene quindi:

$$\text{VNO} = \text{CaNO Ve} + \text{JawNO} \quad (2)$$

In ascissa si ha il flusso d'aria espiratorio in L/min, in ordinata, VNO in nL/min; il coefficiente angolare della retta della retta è pari alla concentrazione di NO alveolare (CaNO), mentre l'intercetta è pari al flusso di NO a livello bronchiale (JawNO) (fig. 10).

RETTE DI REGRESSIONE LINEARE (METODO DI TSOUKIAS)

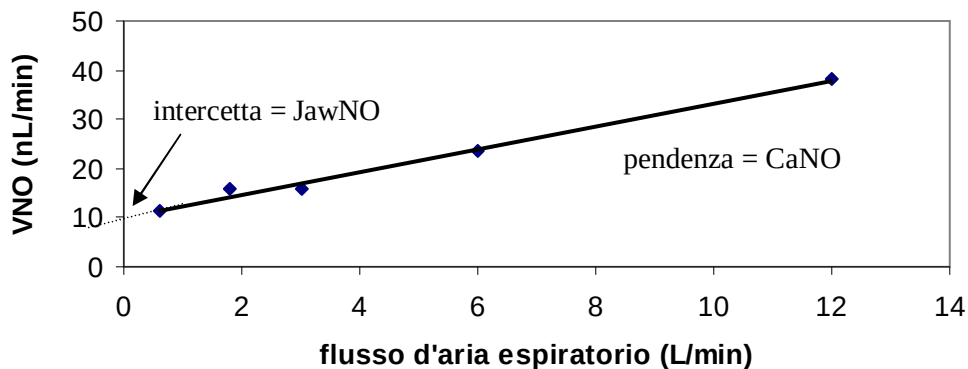


Fig. 10: Esempio di retta di regressione lineare ottenuta con il metodo lineare di Tsoukias; i punti corrispondono ai valori medi di FeNO ottenuti con tre manovre di esalazione per ciascuno dei cinque flussi esalatori utilizzati (10,30,50,100,200 ml/sec).

In tal modo risulta possibile stimare la concentrazione di NO alveolare e il flusso di NO a livello bronchiale mediante un'approssimazione lineare; il coefficiente di determinazione (r^2) è una grandezza matematica che fornisce indicazioni sulla efficacia della approssimazione lineare: più si avvicina a 1 migliore è l'efficacia della approssimazione, e più i parametri stimati si avvicinano a quelli reali.

I parametri “flow-independent” possono essere calcolati su cinque o quattro flussi espiratori; per migliorare l'approssimazione lineare possono essere considerati solo quattro flussi, escludendo quello più basso, che si allontana più degli altri dalla retta di regressione lineare.

Un limite di questo metodo è che è possibile stimare solo due dei quattro parametri incogniti: CaNO e JawNO; non è quindi possibile calcolare né CawNO, né DawNO.

Il metodo non lineare proposto da Högman e Meriläinen [Högman et al, 2000; 2002; 2007] permette invece la stima di tutti e quattro i parametri: fornisce quindi maggiori informazioni rispetto al metodo lineare; l'aspetto negativo di tale metodo è che le equazioni utilizzate per la stima dei parametri flow-independent sono ancora più complesse.

La metodica prevede l'utilizzo di un minimo di tre flussi espiratori costanti, uno ad alto flusso (>300 ml/sec), uno a flusso intermedio (100 ml/sec) e uno a basso flusso (10 ml/sec). Secondo tale approccio, la produzione totale di NO, cioè VNO, è una funzione esponenziale del flusso espiratorio (Ve):

$$VNO = Ve \times FeNO = Ve \times \left[CawNO - (CawNO - CaNO) e^{-DawNO/Ve} \right] \quad (3)$$

Ad alti flussi espiratori, il denominatore Ve della funzione esponenziale è molto maggiore di DawNO; $e^{-DawNO/Ve}$ può essere quindi approssimata a $1 - DawNO/Ve$

In tal modo l'equazione esponenziale può essere approssimata ad una equazione lineare:

$$VNO = CaNO \times Ve + (CawNO - CaNO)DawNO \quad (4)$$

$(CawNO - CaNO)DawNO$ rappresenta il flusso di NO a livello bronchiale, raggiunto ad un flusso esalatorio teorico infinitamente alto. Di conseguenza si può dire che:

$$VNO = CaNO \times Ve + JawNO \quad (5)$$

Quest'ultima rappresenta l'equazione di una retta analoga all'equazione 2) di Tsoukias, dove la pendenza della retta è CaNO, e l'intercetta è JawNO; in ascissa si ha il flusso espiratorio (Ve), e in ordinata VNO (fig. 11).

METODO DI HOGMAN E MERILAINEN PER LA DETERMINAZIONE DI CaNO e JawNO

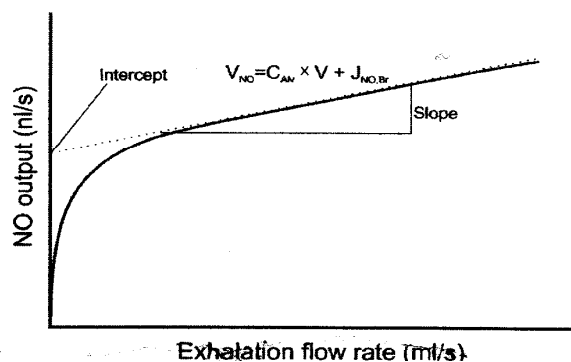


Fig. 11: rappresentazione esemplificativa del metodo di Hogmann e Merilainen; si evidenzia la curva esponenziale che, ad elevati flussi espiratori, può essere approssimata ad una retta.

Gli altri due parametri flow-independent incogniti, DawNO e CawNO, sono calcolati dalla seguente formula esponenziale (rappresentata graficamente in figura 12):

$$FeNO = CawNO \left(1 - e^{-DawNO/Ve} \right) + CaNO e^{-DawNO/Ve} \quad (6)$$

CURVA ESPONENZIALE DI HOGMAN E MERILAINEN PER LA DETERMINAZIONE DI CawNO e DawNO

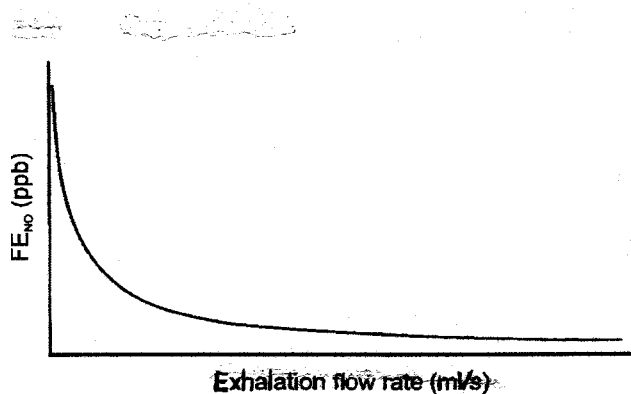


Fig. 12: Rappresentazione grafica dell'equazione 6.

Uno specifico algoritmo formulato da Högman e Meriläinen, permette sia l'approssimazione della funzione esponenziale 3) a lineare, sia la risoluzione della equazione esponenziale 9), contemporaneamente.

Poiché il metodo di misura è sperimentale, ci possono essere degli errori legati alla misurazione che possono alterare i valori dei parametri calcolati. Gli autori hanno evidenziato che la condizione richiesta per poter applicare l'equazione 6) in modo da ottenere valori di $CawNO$ e $DawNO$ validi è che deve essere vera la seguente condizione:

$$\frac{FeNO_{basso} - FeNO_{medio}}{FeNO_{medio} - FeNO_{alto}} < \frac{Ve_{alto}}{Ve_{basso}} \frac{Ve_{medio} - Ve_{basso}}{Ve_{alto} - Ve_{medio}}$$

Se ciò non viene rispettato, significa che i dati presentano troppi errori di misurazione, che possono riguardare sia $FeNO$, sia il flusso, sia entrambi. Inoltre è richiesto ovviamente che $CaNO$ sia positiva [Högman et al, 2007].

Il metodo non lineare è stato utilizzato anche da Pietropaoli [Pietropaoli et al, 1999] e da Silkoff [Silkoff et al, 2000], stimando i parametri flow-independent in modo lievemente diverso da Högman e Meriläinen. Pietropaoli e al. hanno utilizzato sei flussi esalatori costanti, variabili tra 6 e 1355 ml/sec; Silkoff e al. ne hanno utilizzati invece nove, tra 4 e 1550 ml/sec. Per entrambi l'equazione di riferimento è la medesima:

$$FeNO = CawNO + \left[CaNO - CawNO \right]^{DawNO/Ve} \quad (7)$$

Anche in questo caso, poiché ad alti flussi espiratori, il denominatore Ve della funzione esponenziale è molto maggiore di $DawNO$, $e^{-DawNO/Ve}$ può essere approssimata a $1 - DawNO/Ve$; in tal modo l'equazione esponenziale può essere approssimata ad una equazione lineare.

Pietropaoli e al. hanno stimato i parametri flow-independent mediante la retta:

$$FeNO = CaNO + JawNO \cdot 1/Ve \quad (8)$$

In ascissa si ha $1/Ve$ e in ordinata $FeNO$; la pendenza della retta è $JawNO$, e l'intercetta è $CaNO$. Il metodo per ottenere tali parametri incogniti risulta essere esattamente il contrario dell'equazione (2), ottenuta da Tsoukias e al.

Poiché $VNO = Ve \times FeNO$, moltiplicando Ve per l'equazione (7), Silkoff e al. ottengono:

$$VNO = Ve \times \left[CawNO + CaNO - CawNO \right]^{DawNO/Ve} \quad (9)$$

che viene sostituita mediante le precedenti assunzioni, dalla seguente equazione lineare:

$$VNO = CaNO \cdot Ve + JawNO \cdot DawNO \quad (10)$$

In questo caso in ascissa si ha $FeNO$ e in ordinata VNO ; la pendenza della retta è $-DawNO$ e come intercetta $JawNO/DawNO$; con tale metodo, si riescono quindi a stimare solamente $JawNO$ e $DawNO$, e non si ottengono né $CaNO$, né $CawNO$.

Non c'è opinione univoca per quanto riguarda la scelta tra il metodo lineare e non lineare, poiché vengono ritenuti entrambi validi. Sono ancora scarsi gli studi per appurare quale dei due metodi permetta la stima migliore dei parametri flow-independent: secondo Sepponen [Sepponen et al, 2008] il metodo lineare fornisce una stima migliore dei parametri flow-independent rispetto al metodo non lineare; secondo Roy, al contrario, è stato evidenziato che il metodo non lineare è da preferire, perché presenta una percentuale di errore minore rispetto a quello lineare [Roy et al, 2007].

E' stato inoltre dimostrato da Roy [Roy et al, 2007], in accordo con quanto evidenziato da Högman, che, confrontando i valori dei parametri flow-independent calcolati con i metodi lineare e non lineare, $JawNO$ e soprattutto $CaNO$ risultano essere i più influenzati dal tipo di metodo utilizzato; una possibile spiegazione è data dal fatto che $JawNO$ con il metodo lineare è considerato come prodotto tra $CawNO$ e $DawNO$, mentre con il metodo non lineare $JawNO$ risente anche di $CaNO$ [Sepponen et al, 2008].

$CawNO$ risulta essere il parametro meno influenzato dal tipo di metodo, anche se il metodo di Silkoff dà valori di $CawNO$ significativamente più elevati [Roy et al, 2007; Högman et al, 2000; 2002; 2007]; $DawNO$ risulta significativamente più basso con i metodi sia di Silkoff sia di Pietropaoli [Högman et al, 2007].

Sono stati recentemente suggeriti dei range di normalità per i parametri flow-independent in una popolazione sana: $CaNO$, 0–4 ppb; $JawNO$ 0.8-1,6 nL/sec; $CawNO$, 50–250 ppb; $DawNO$, 5–15 ml/sec [Högman et al, 2009].

Stima dei parametri flow-independent considerando la diffusione assiale retrograda

La produzione di NO non è costante nell'albero bronchiale: la maggior quota dell'NO esalato deriva dalle generazioni 0°-3° e in particolare la produzione dalla 0 alla 2° generazione è circa la metà della produzione totale di NO esalato [Kerckx e al, 2008; Silkoff et al, 1998]. L'approccio migliore sembrerebbe pertanto quello di associare la retrodiffusione al modello a tromba: in questo modo, rispetto al modello bi-compartmentale, aumenta in modo significativo la perdita di NO verso la regione alveolare. Ciò è dovuto al fatto che il tasso di

diffusione assiale è proporzionale al prodotto tra il gradiente di concentrazione e la sezione trasversa dell'area. Il considerevole aumento della superficie della sezione trasversale nelle regioni periferiche del polmone riduce in modo rilevante la resistenza alla diffusione dell'NO verso la direzione assiale. E' quindi evidente come l'importanza della diffusione assiale sia maggiore a livello dei bronchioli e degli alveoli polmonari. Ne risulta una sottostima di JawNO e di DawNO anche del 50% e una sovrastima di CaNO; il fenomeno è spiegato con il fatto che a causa del gradiente di concentrazione di NO tra le vie aeree e gli alveoli ($C_{awNO} > C_{aNO}$), si verifica passaggio di NO dalle vie aeree agli alveoli polmonari [Shin et al, 2002; Van Muylem et al, 2003].

Al variare del flusso varia anche il peso della diffusione assiale. E' stato dimostrato che applicando la diffusione assiale per flussi elevati (200-500ml/sec) si ottengono valori di CaNO vicini a 0 ppb e prossimi a quelli calcolati con il metodo lineare. Se invece si eseguono misurazioni a bassi flussi (10-150ml/sec) CaNO aumenta. Ciò è dovuto allo spostamento dell'equilibrio tra convezione e diffusione di NO. La quantità di trasporto convettivo di NO aumenta in proporzione al flusso di espirazione, ma non incide sul tasso di trasporto assiale diffusivo. Tanto maggiore è il flusso delle vie aeree, tanto maggiore è il gradiente di NO nelle vie aeree e quindi il maggiore impatto della diffusione assiale [Concorelli et al, 2002 e 2007].

Tenendo in considerazione la back-diffusion può essere applicata la cosiddetta "correzione di Concorelli" al metodo di calcolo di CaNO e JawNO [Concorelli et al, 2007]. Secondo alcuni autori solo applicando tale correzione i parametri flow-independent ottenuti con i metodi lineare e non lineare hanno risultati quantitativamente e statisticamente simili [Kerckx e al, 2008]. Utilizzando tale correzione è possibile, applicando una formula matematica, ottenere CaNO corretto e JawNO corretto, acquisendo dei risultati pressoché identici a quelli ottenuti considerando il complicato modello della tromba [Concorelli et al, 2007].

CONVERSIONE DI CONDORELLI A FLUSSI 50-250ml/sec:

Alla retta ottenuta con il modello bi-compartimentale, $y = ax + b$, ovvero

$$VNO = CaNO \cdot V_e + JawNO \quad (2)$$

i valori di JawNOcorretto e CaNOcorretto si ottengono così:

$$JawNO_{corretto}[pl/sec] = JawNO \times 1,7 \quad (11)$$

$$CaNO_{corretto} [ppb] = CaNO - (JawNO / 740) \quad (12)$$

Applicazione clinica dei parametri "flow-independent"

Dagli studi condotti [Lehtimäki et al, 2001; Brindicci et al, 2007; Roy et al, 2007; Högman et al, 2007; Silkoff et al, 2000] si è evidenziato un aumento di JawNO nei pazienti asmatici, effetto dell'induzione della iNOS a livello bronchiale, non solo di cellule epiteliali, ma anche di macrofagi, eosinofili, neutrofili, presenti in seguito al processo infiammatorio [Hamid et al, 1993; Renington et al, 2001]. Anche in caso di un buon controllo della sintomatologia, in pazienti con asma moderato, ma stabile, JawNO risulta essere elevato rispetto ai sani.

Il trattamento con ICS è efficace nel ridurre JawNO: pazienti con asma severo in trattamento con ICS hanno valori di JawNO più bassi rispetto ai pazienti non in trattamento con ICS: i corticosteroidi sono infatti in grado di inibire iNOS [Radomsky et al, 1990; Kleinert et al, 1996] JawNO è comunque più alto rispetto ai sani o perché il farmaco non raggiunge tutti i siti del processo infiammatorio, o perché si ha una ridotta responsività alla terapia cortisonica, il che è un importante indice di asma severo e persistente. In quest'ultimo gruppo di pazienti, anche in caso di terapia cortisonica orale, JawNO rimane elevato.

Nell'asma di recente diagnosi, si è rilevato inoltre un aumento di DawNO [Lehtimäki et al, 2001; Brindicci et al, 2007; Silkoff et al, 2000]: la parete bronchiale non funge solo da fonte produttrice di NO, ma rappresenta anche una barriera per la sua diffusione; in caso di danno all'epitelio bronchiale, come nell'asma, si avrà pertanto anche un aumento di DawNO [Högman et al, 2002].

A differenza di JawNO, DawNO non viene modificato dalla terapia con ICS: questo potrebbe essere dovuto al fatto che iNOS si localizza in aree dove sono espresse isoforme di cNOS, insensibili alla terapia con ICS [Lehtimäki et al, 2001; Brindicci et al, 2007].

Secondo Silkoff e al. l'aumento di DawNO potrebbe essere una iniziale manifestazione di malattia asmatica, prima della comparsa dell'iperreattività bronchiale o della sintomatologia. Inoltre, poiché una forte iperreattività bronchiale si associa a più bassi valori di DawNO, un basso DawNO in un paziente con asma ben stabilizzato potrebbe indicare la presenza di alterazioni strutturali e funzionali delle vie aeree, indicando una fase avanzata della patologia, con un importante rimodellamento. E' stato supposto che la misura di DawNO può quindi essere utile nel fornire informazioni aggiuntive sia nei soggetti sani per la diagnosi di asma, sia negli asmatici nel monitoraggio della patologia [Silkoff et al, 2000].

Anche i pazienti con rinite allergica, ma senza sintomatologia respiratoria riconducibile ad asma, possono presentare un aumento di DawNO. La gran parte di questi pazienti presentano iperreattività bronchiale e sviluppano nel tempo asma; DawNO potrebbe quindi essere

utilizzato come indice per predire l'iperreattività bronchiale. [George et al, 2004; Högman et al, 2002].

Anche CawNO è elevato nei pazienti asmatici; la terapia con ICS è efficace nel ridurla [Högman et al, 2007; Silkoff et al, 2000]. A differenza di DawNO, CawNO non è aumentata in caso di rinite allergica [Högman et al, 2002; 2007].

CaNO è aumentata in condizioni associate ad infiammazione delle vie aeree distali, quali alveolite allergica estrinseca, interstiziopatie, BPCO, asma in fase avanzata [George et al, 2004; Lehtimäki et al, 2001; Brindicci et al, 2007]. In un soggetto sano, CaNO dovrebbe essere quasi zero; un aumento può essere dovuto alla presenza di infiammazione sistemica, in seguito all'attivazione di iNOS alveolare da parte delle citochine infiammatorie sistemiche, oppure a un ridotto uptake dovuto al mismatch ventilo-perfusorio, come si verifica nella BPCO [Högman et al, 2002; 2007]. A differenza di JawNO e di CawNO, la terapia con ICS non riduce CaNO perché, probabilmente, il farmaco per via inalatoria non riesce a raggiungere le vie aeree più distali; ciò è confermato dal fatto che CaNO è invece diminuita dai corticosteroidi per via orale [Lehtimäki et al, 2001; Brindicci et al, 2007].

Nell'asma di recente diagnosi, a differenza di JawNO e di DawNO che aumentano, CaNO rimane nella norma: il processo infiammatorio è quindi localizzato prevalentemente nelle vie aeree; in pazienti asmatici cronici, invece, si verifica anche l'aumento di CaNO: ciò fa porre l'ipotesi che l'intensità e la sede dell'infiammazione possano variare nel corso della malattia [Lehtimäki et al, 2001; Brindicci et al, 2007]. Una possibile ipotesi è che, anche se nella fase iniziale della malattia asmatica si ha un aumento di produzione di NO a livello alveolare, CaNO non aumenta in quanto l'integrità della membrana alveolo-capillare permette la rapida diffusione dell'NO nella circolazione polmonare, dove l'NO viene legato all'Hb con elevata affinità; nell'asma in fase avanzata, a causa di un importante rimodellamento, il trasporto dell'NO attraverso la membrana alveolo-capillare non sarebbe più così efficace, con conseguente aumento di CaNO [Lehtimäki et al, 2001].

Sia negli asmatici, sia nei sani, non si è rilevata alcuna correlazione tra la capacità vitale (CV) o il volume respiratorio massimale in un secondo (FEV1) e i parametri "flow-independent", come con FeNO [Lehtimäki et al, 2001; Brindicci et al, 2007]: ciò suggerisce che la misura dell'NO frazionato non può essere utilizzata per la valutazione della funzionalità polmonare.

La misura dell'ossido nitrico esalato nel test di broncostimolazione specifico con isocianati

La misura dell'NO esalato rappresenta una metodica utile durante il test di stimolazione specifico con isocianati per il completamento diagnostico, e per analizzare il danno secondario a determinate esposizioni lavorative direttamente dove questo viene indotto. Ferrazzoni e al. hanno evidenziato una riduzione significativa di FeNO nelle prime 2 ore dall'esposizione ad isocianati, con un aumento progressivo che raggiunge il massimo livello a 48 ore dall'esposizione [Ferrazzoni et al, 2009] (fig. 13). Anche Barbinova e Kharitonov hanno evidenziato un aumento di FeNO dopo la 22 ora dall'esposizione [Barbinova et al, 2006; Kharitonov et al, 1995].

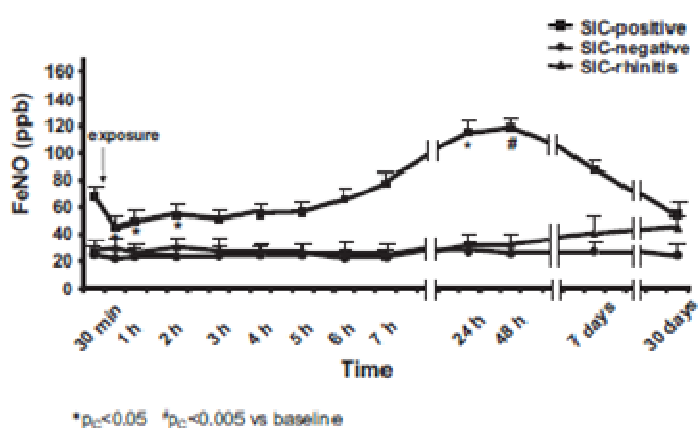


Fig. 13: FeNO durante test di broncostimolazione specifico con isocianati in soggetti sensibilizzati (SIC-positivi), non sensibilizzati (SIC-negativi) e sensibilizzati con rinite allergica (SIC-rhinitis). I dati sono espressi come media geometrica $\pm$ errore standard.

La causa della riduzione di FeNO nel corso della risposta immediata ad isocianati non è ben chiara: è stato ipotizzato che possa essere dovuta alla broncoostruzione delle vie aeree che intrappola l'NO prodotto, impedendo la fuoriuscita nell'aria esalata [De Gouw et al, 1998; Ho et al, 2000; Piacentini et al, 2002]; Maestrelli [Maestrelli et al, 2007] e Shin [Shin et al, 2002] ipotizzano invece che la riduzione del calibro delle vie aeree in corso di broncoostruzione determini un aumento della velocità delle vie aeree, riducendo il tempo in cui l'NO prodotto nelle vie aeree può passare nel lume, e quindi anche l'NO misurato nell'aria esalata.

Dimetilarginina Asimmetrica (ADMA) ed asma

La dimetilarginina asimmetrica (ADMA) è un analogo dell'L-arginina e funziona come inibitore della NOS. Da alcuni anni è utilizzata come biomarker sia descrittivo che predittivo di patologie indotte da stress ossidativo. I suoi livelli sono risultati aumentati in biopsie polmonari ed in campioni di espettorato sia in pazienti con fibrosi cistica che in asmatici. Il polmone è la maggior fonte di ADMA e studi passati hanno dimostrato che essa può disattivare l'NO sintetasi determinando una riduzione della sintesi di NO ed aumentando la sintesi di O₂⁻ (superossido) [Bulau, 2007]. Questi due componenti (NO e O₂⁻) reagiscono rapidamente formando ONOO⁻ (perossinitrito) il quale contribuisce allo stress ossidativo ed incrementa i processi di danno cellulare ossidativo, infiammazione delle vie aeree ed iperreattività bronchiale. Nel determinarsi di un circolo feed-forward, l'incremento dello stress ossidativo sembra promuovere l'accumulo di ADMA inibendo DDAH (dimetilarginina dimetilaminoidrolasi) ed inducendo PRMT (protein arginin dimethyltransferases) (Fig 14).

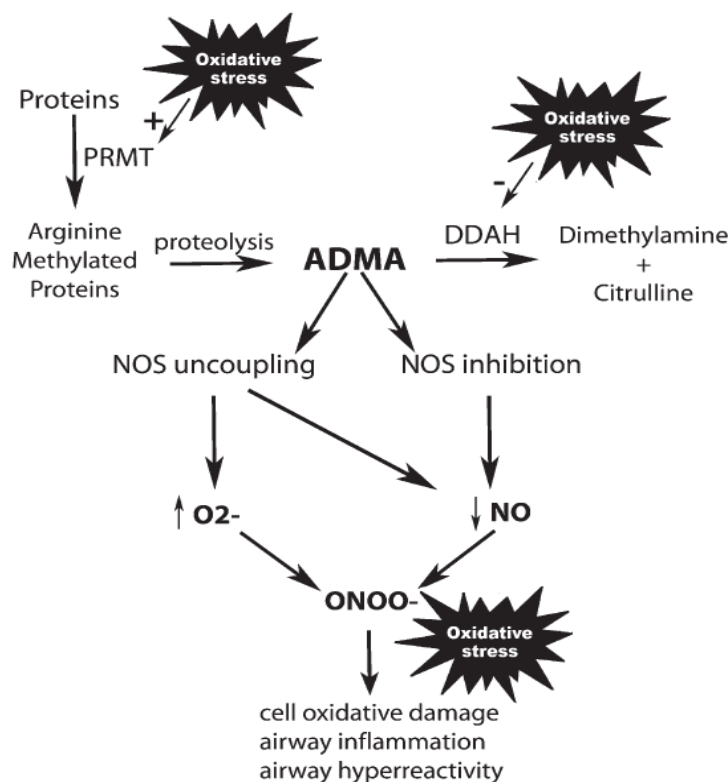


Fig. 14 Ciclo dell'ADMA.

L'ADMA è rinvenibile anche nel condensato dell'aria esalata (EBC, exhaled breath condensate), matrice ottenibile in modo non invasivo ed utile allo studio dei processi patologici delle vie aeree.

Tralasciando quanto riscontrato per ADMA ed il rischio cardiovascolare da danno endoteliale in cui risulta implicata (soprattutto relativamente allo sviluppo del diabete, l'aterosclerosi, l'ipercolesterolemia, l'insufficienza renale cronica), gli studi sulle relazioni fra ADMA ed asma sono molto pochi, in particolare se considerati quelli su esseri umani [Scott, 2011]. Alcuni hanno riscontrato un aumento di questo marker di stress ossidativo nell'EBC ed a livello ematico in bambini asmatici, a prescindere dalla terapia corticosteroidica più o meno in corso [Carraro, 2013]. In uno studio su una popolazione mista, pediatrica ed adulta, è stata documentata una marcata e significativa riduzione dei livelli sistemici di ADMA nel corso di esacerbazioni asmatiche [Morris, 2004]. Altri non hanno riscontrato alcuna diversità fra i livelli ematici di ADMA in bambini sani ed bambini asmatici [Lau, 2013]. Quest'ultimo riscontro potrebbe essere legato anche ad un limite degli studi che non avendo il dato compartimentalizzato delle vie aeree, potrebbero non aver rilevato una confinata disregolazione dell'ADMA/metabolismo dell'L-arginina. In uno studio di Scott et al condotto su un campione adulto di 10 soggetti affetti da asma allergica l'ADMA risultava aumentare significativamente nell'espettorato indotto post-test con metacolina, in concomitanza con la comparsa di broncoostruzione [Scott et al, 2014]. Tale dato suffragherebbe l'ipotesi di un coinvolgimento dell'ADMA nell'instaurarsi della risposta asmatica.

Nulla è noto rispetto alle dinamiche dell'ADMA nell'asma occupazionale e tantomeno nel corso del SIC con isocianati.

Temperatura dell'aria espirata (EBT)

Come già ricordato l'asma è una malattia infiammatoria delle vie aeree. All'esame istologico della parete bronchiale è stato ampiamente documentato un incremento della vascolarizzazione e del flusso sanguigno bronchiale [Carroll, 1997; Li, 1997; Kumar, 1998]. Questi cambiamenti contribuiscono alla regolazione della temperatura delle vie aeree ed al tono muscolare [Gilbert, 1992]. Una riduzione della temperatura delle vie aeree può scatenare una broncoostruzione che si può ridurre diminuendo la vascolarizzazione mucosale tramite noradrenalina, suggerendo che la vascolarizzazione mucosale e la temperatura delle vie aeree siano strettamente correlate. È noto che la temperatura delle vie aeree abbia un ruolo

importante nell'asma, confermato dal fatto che le vie aeree di soggetti asmatici si riscaldano più rapidamente del normale dopo l'iperventilazione o l'attività fisica [Gilbert, 1987]. Questi riscontri fanno supporre che l'iperemia delle pareti dell'albero tracheobronchiale possa contribuire al restringimento bronchiale ed ad un più rapido riscaldamento dell'aria esalata. Svariati mediatori dell'infiammazione coinvolti nell'asma possono promuovere la vasodilatazione bronchiale. Un ruolo chiave lo ricopre l'NO, come vasodilatatore bronchiale ed aumentando il flusso ematico bronchiale. Paredi et al nel 2002 ipotizzarono pertanto che nei pazienti asmatici, date le alte concentrazioni di NO che li caratterizzano, si dovesse riscontrare un incremento della temperatura dell'aria espirata (EBT). In tale occasione veniva per la prima volta effettuata la misurazione dell'EBT in 34 soggetti, 18 asmatici e 16 controlli sani. Lo studio riscontrava un più rapido aumento dell'EBT durante un singolo espiro negli asmatici rispetto ai sani e questo correlava all'aumentata concentrazione di NO esalato dai pazienti affetti da asma. Si documentava inoltre una debole correlazione negativa fra la quota di incremento dell'EBT e la broncoostruzione determinata misurando il FEV1. Questo veniva spiegato da una riduzione del calibro delle vie aeree causata dall'aumento della vascolarizzazione e del flusso ematico bronchiale; ipotesi supportata anche dal riscontro in pazienti con asma grave di un aumento di vascolarizzazione delle vie aeree rispetto ai soggetti con forme lievi-moderate [Paredi, 2002; Carroll, 1997; Li, 1997].

L'attività di iNOS è dipendente dalla temperatura quindi elevate temperature nelle vie aeree dei pazienti asmatici possono indurre un'ulteriore sintesi di NO [Venturini, 1999]. La metodica è stata applicata negli anni soprattutto nei bambini, nei quali la non invasività e la facile esecuzione dell'indagine sono particolarmente rilevanti e rappresentano elementi di promozione dell'utilizzo di una metodica e della verifica dei suoi vantaggi e/o limiti.

Uno studio del 2007 [Piacentini, 2007] confermava il riscontro di Paredi et al. L'EBT dei bambini asmatici era infatti significativamente maggiore che nei controlli sani e correlava positivamente sia col FeNO che con la percentuale di eosinofili nell'espettorato indotto. In uno studio del 2010 Carraro et al monitoravano l'EBT ed il FeNO di bambini affetti da esiti di displasia broncopolmonare e bambini asmatici e riscontravano nei primi valori di EBT e concentrazioni di FeNO significativamente più bassi a suffragare l'ipotesi di diversi meccanismi patogenetici caratterizzanti le due malattie [Carraro, 2010]. Lo stesso gruppo nel 2012 riportava un aumento significativo dell'EBT dopo attività fisica in un gruppo di bambini asmatici, aumento più rilevante nei soggetti con malattia mal controllata piuttosto che in quelli con malattia sotto controllo, in assenza di un influenza del trattamento con ICS [Peroni,

2012]. Nel considerare l'EBT come un marker non invasivo surrogato dell'infiammazione delle vie aeree, Xepapadaki et al hanno indagato eventuali differenze fra l'EBT di bambini in fase di asma controllata ed in periodi di esacerbazioni indotte da virus ed ne hanno riscontrato un aumento proprio nel corso di eventi infettivi se confrontato con l'EBT di non asmatici incorsi in infezione virale [Xepapadaki, 2010]. Sempre in un gruppo di bambini asmatici è stato condotto uno studio pilota volto a verificare la possibile correlazione fra la concentrazione di metalloproteinasi-9 (MMP-9, considerata un mediatore dell'infiammazione delle vie aeree e del rimodellamento nell'asma) nel surnatante dell'espettorato indotto e l'EBT. La correlazione fra questi due dati risultava positiva e veniva spiegata come la risultante della stretta relazione fra il rimodellamento e la vascolarizzazione tipiche dell'asma [Piacentini, 2008]. In uno studio condotto su 44 pazienti aventi un sospetto radiologico di tumore polmonare si è misurato nel EBC la concentrazione di leucotriene-4 (LTB-4, come marker di infiammazione) e di fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF, come marker di neoangiogenesi) nonché l'EBT. L'EBT è risultato aumentato in soggetti con cancro polmonare ed il VEGF era un predittore del suo incremento, dati questi che hanno fatto ipotizzare un uso del monitoraggio dell'EBT nel monitoraggio della progressione metastatica per via angiogenetica e rimarcato la correlazione fra temperatura delle vie aeree e vascolarizzazione [Carpagnano, 2015]. In uno studio su 159 bambini asmatici appena pubblicato [Hamill, 2016] sono state indagate le relazioni fra l'EBT e le decisioni mediche in merito al trattamento asmatico, il controllo di malattia, la funzionalità polmonare ed il FeNO. È emerso che i livelli dell'EBT non erano correlati con le decisioni dei pediatri di modificare la terapia cortisonica inalatoria e nemmeno con il controllo dei sintomi asmatici, la funzionalità respiratoria ed il FeNO, rivelandosi quindi una metodica non usufruibile per modulare la terapia antinfiammatoria. In 100 adulti asmatici e 50 volontari sani García et al hanno invece valutato se vi fosse un incremento dell'EBT in soggetti con asma non controllata. Veniva osservato un aumento dell'EBT statisticamente significativo in questi ultimi rispetto agli asmatici ben controllati ed ai controlli sani, concludendo che l'EBT si potesse ritenere un valido indicatore dello stato infiammatorio delle vie aeree nell'asma [García 2013]. Ad oggi non vi sono dati relativi all'EBT nel corso di test specifico con isocianati o altre singole specie chimiche di sensibilizzanti professionali.

SCOPO DELLA TESI

Nonostante l'asma sia stata considerata per anni come un'unica malattia, studi recenti ne dimostrano l'eterogeneità. I fenotipi dell'asma sono stati analizzati con approccio multivariato in ampie popolazioni con asma comune ma non è noto se l'asma professionale da isocianati rappresenti o meno un unico fenotipo.

Mediante l'utilizzo di un approccio multivariato dato dall'analisi gerarchica dei cluster e di un ampio pool di variabili appropriate abbiamo studiato se i soggetti affetti da asma professionale da isocianati rappresentino uno o più cluster. Mediante un altro approccio multivariato, dato dall'analisi delle k-medie, si sono poi individuate le caratteristiche che differenziano in maniera significativa i soggetti distribuiti nei diversi cluster.

Dato che le dinamiche dell'asma occupazionale da isocianati sono controverse e meno chiare che nell'asma comune, si è deciso di approfondire lo studio della risposta infiammatoria nel corso dei SIC con isocianati con metodiche non invasive.

In particolare, dato il precedente riscontro di un aumento dell'NO esalato (misurato ad un flusso espiratorio di 50 ml/s, FeNO₅₀) nel corso dei SIC, si è proceduto ad indagarne l'origine, se alveolare o bronchiale, applicando l'analisi dei parametri flow-indipendent. In secondo luogo, considerando che l'ADMA è un inibitore endogeno dell'NO sintetasi e che la temperatura dell'aria esalata è stata proposta come marker di infiammazione delle vie aeree che nell'asma comune aumenta con l'aumentare del FeNO, si è studiato il loro profilo nel corso del processo infiammatorio sperimentalmente indotto con isocianati.

MATERIALI E METODI

A) Materiali e metodi dello studio sui fenotipi dell'asma occupazionale da isocianati

Sono state prese in esame le cartelle cliniche di tutti i soggetti ricoverati e dimessi con diagnosi di asma professionale da isocianati, ottenuta mediante l'esecuzione del test di provocazione bronchiale specifico (SIC) con isocianati (TDI, MDI e HDI), nel periodo compreso tra il 1988 e il 2013 presso il Servizio di Fisiopatologia Respiratoria – U.O.C. Medicina del Lavoro dell'Azienda Ospedaliera e Università di Padova. Dalle cartelle cliniche sono stati ricavati i dati inerenti a 63 variabili rilevanti comprendenti informazioni su caratteristiche antropometriche, cliniche e di funzionalità respiratoria dei 187 pazienti reclutati per lo studio. Per lo scopo dello studio, il numero iniziale di 63 variabili è stato ridotto a 13, considerando solamente quelle per le quali c' erano informazioni complete nella maggior parte dei pazienti (sesso, età, MBI, abitudine al fumo di sigaretta, IT, FEV1 % del predetto basale, PD20 pre test di esposizione specifica, % di eosinofili e neutrofili a livello ematico, agente, tipo di reazione, età d'esordio dei sintomi, storia di atopia). Le 13 variabili con dati completi sono state utilizzate al fine di stabilire, mediante l'analisi gerarchica dei cluster, il numero di cluster in cui è possibile suddividere i soggetti affetti da asma bronchiale da isocianati. Successivamente le stesse 13 variabili sono state impiegate anche nell'analisi delle k-medie, al fine di creare i tre cluster e stabilire le diverse caratteristiche che differenziano in maniera significativa i soggetti appartenenti ai tre diversi gruppi.

Casistica e variabili

Sono stati considerati 187 pazienti, risultati positivi al test di provocazione bronchiale specifico (SIC) per isocianati, nel periodo compreso tra il 1988 e il 2013. Sono stati invece esclusi tutti i pazienti negativi al test di esposizione specifica per i quali la diagnosi di asma professionale è stata esclusa o è risultata dubbia.

I dati raccolti, mediante consultazione delle cartelle cliniche archiviate, sono quelli relativi a:

- caratteristiche antropometriche: sesso, età, peso, altezza, BMI;
- anamnesi fisiologica: abitudine al fumo di sigaretta, storia di sensibilizzazione ad inalanti e/o alimenti e di intolleranza a farmaci;
- anamnesi lavorativa: mansioni lavorative attuali e pregresse e rispettive esposizioni ad agenti potenzialmente asmogeni ed in particolare ad isocianati; dato quest'ultimo supportato e

confermato dall'analisi delle schede di sicurezza relative alle sostanze utilizzate in ambiente di lavoro, fornite dal lavoratore stesso o dal datore di lavoro; inizio, durata e modalità di esposizione; utilizzo di DPI;

- anamnesi patologica prossima: presenza di sintomatologia respiratoria suggestiva di asma bronchiale in atto con modalità/tempistica d'insorgenza ed in particolare raccolta di informazioni relative all'andamento della sintomatologia ed al test arresto-ripresa; presenza anche di sintomatologia rinitica o oculorinitica o di patologie cutanee su base allergica; pregressa esecuzione di prove di funzionalità respiratoria che abbiano mostrato un quadro suggestivo di asma bronchiale in atto;

- esami ematochimici: emocromo con formula leucocitaria (% eosinofili e % neutrofili) e IgE totali;

- visita allergologica, effettuata in regime di ricovero, per verificare lo stato di atopia, con esecuzione degli skin prick test per i comuni inalanti;

- prove di funzionalità respiratoria, ed in particolare:

- Spirometria: per le misurazioni è stato utilizzato uno spirometro a secco (PFT Horizonmod. 922, Sensor Medics); i volumi polmonari mobilizzabili sono stati valutati secondo le direttive dell'ERS (European Respiratory Society). I soggetti hanno effettuato tre prove e sono stati utilizzati i valori migliori di capacità vitale forzata (FVC) e volume espiratorio massimo al primo secondo (FEV1), volume residuo (VR) e capacità polmonare totale (CPT). I valori di FVC, FEV1, il rapporto FVC/FEV1 (indice di Tiffenau), e la CPT sono stati confrontati con i valori teorici degli stessi, predetti dalla Communauté Européenne du Carbone et de Acier (CECA 71);

- NO esalato (relativamente ad un numero limitato di pazienti): la misurazione dell'ossido nitrico, metodica non invasiva che consente di quantificare l'infiammazione bronchiale eosinofila, è stata ottenuta utilizzando un analizzatore a chemiluminescenza (NIOX, Nitric Oxide Monitoring System, version 2.0, Aerocrine AB, Solna, Sweden), in grado di registrare in tempo reale i valori di FeNO, riprodotti in forma di grafico concentrazione/tempo su un monitor collegato all'analizzatore. La strumentazione NIOX comprende: un computer e l'analizzatore di NO, una tastiera e un display. Sul display, oltre ad apparire il profilo della concentrazione dell'NO esalato si visualizzano automaticamente FeNO misurato in ppm (equivalente a nL/L), e VNO misurato in nL/min, che rappresenta la

produzione di NO e viene calcolato dal prodotto di FeNO in nL/L (al momento del plateau) e flusso espiratorio in L/min. FeNO viene calcolato dal software facendo una regressione dell'ultimo 30% della curva, al momento del plateau; le oscillazioni tra il punto massimo e minimo del plateau non devono superare i 5 ppb o il 10%. Il limite di risoluzione dello strumento è 1 ppb e il tempo di risposta di 200 ms; l'analizzatore è sensibile per un range di concentrazione di NO tra 0 e 25000 ppb. La misura è stata eseguita secondo le indicazioni ATS [Dweik et al, 2011]. Per quanto riguarda la metodica standard, con un flusso espiratorio di 50 ml/s, la durata dell'esalazione è stata di 8 secondi.

- Test di provocazione bronchiale aspecifico con metacolina: i soggetti hanno eseguito 5 inalazioni di soluzione fisiologica, tamponata a pH 7.4 con fosfato mono-bisodico (PBS), ognuna delle quali seguita dalla misura del FEV1 (considerando il migliore di tre misure), per ottenere il valore base del test. Quindi è stata somministrata una soluzione con metacolina in PBS a concentrazioni crescenti. Le concentrazioni usate sono state di 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4mg/ml, 8mg/ml, 16 mg/ml, 32 mg/ml, corrispondenti a dosi cumulative da 22 µg a 1440 µg. Per produrre l'aerosol è stato impiegato un nebulizzatore De Vilbiss 646, collegato a un dosimetro di Rosenthal French. Nel nebulizzatore si è sono collocati 3 ml di soluzione di metacolina (alla concentrazione di 64 mg/ml), alimentato da aria compressa a 50 psi di pressione in uscita. Per ciascuna delle 5 inalazioni sono stati nebulizzati 45 ± 3 l di soluzione. Ognuna delle 5 inalazioni, della durata di 5 secondi ciascuna, è stata seguita da 5 secondi di apnea. Dopo un minuto dall'esposizione di ciascuna dose di meta colina, si è misurato il FEV1. La reattività alla metacolina è espressa come PD₂₀ FEV1, cioè come dose di metacolina in grado di determinare una caduta del FEV1 di almeno il 20% rispetto alla base. Affinchè il test dimostri una iperreattività bronchiale il crollo di almeno il 20% del FEV1 deve avvenire a una dose di metacolina inferiore a 1440 µg.

- Test di provocazione bronchiale specifico con isocianati: il test è stato eseguito ponendo ciascun soggetto in una camera di 9 m³ ed esponendolo per un periodo di 30 minuti a concentrazioni tra 4 e 12 ppb di isocianati. La concentrazione di isocianati nella camera è stata misurata in continuo con un analizzatore (SPM Single Point Monitor, Zellweger Analysis Ltd, UK). I vapori di toluene di isocianato (TDI) sono stati generati nella cabina di esposizione facendo passare un flusso di 2 l/min di aria in una bottiglia di vetro da 200 ml contenente 20 ml di TDI; i vapori di metilen-4-4-diisocianato (MDI) sono stati ottenuti ponendo un campione di 3 ml su un vetrino d'orologio in un baker di vetro pirex, riempito per circa un terzo del suo volume con sabbia riscaldata a 70°C. Mantenendo la temperatura della

sabbia costante, l'MDI può essere esalato dopo alcuni minuti; la sua concentrazione può essere facilmente mantenuta costante agendo sull'aspirazione forzata dell'aria in cabina. Per rendere omogenea la distribuzione dell'isocianato nella cabina è stata usata una ventola fissata al soffitto. La temperatura della camera è stata mantenuta stabile a circa 24°C. La durata dell'esposizione ad isocianati è stata di 30 minuti, o fino all'insorgenza dei sintomi. Per valutare l'eventuale broncoostruzione si è misurato il FEV1 subito prima dell'inizio del test, dopo 1, 5, 15 e 30 minuti dall'esposizione, alla prima ora, e poi ogni due ore fino alla settima ora dall'esposizione. Il test di provocazione bronchiale specifico è stato considerato positivo quando si è verificato un crollo di almeno il 20% del FEV1 rispetto al valore basale entro la prima ora dall'esposizione (reazione di tipo immediato o early) o dopo due o più ore dal SIC (reazione di tipo ritardato o late).

Analisi statistica

I dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard. E' stato utilizzato il metodo dei cluster gerarchico di Ward della minima varianza per individuare il numero di cluster. Le variabili inserite sono state: sesso, età, MBI, abitudine al fumo di sigaretta, IT, FEV1 % del predetto basale, PD20 pre test di esposizione specifica, % di eosinofili e neutrofili a livello ematico, agente, tipo di reazione, età d'esordio dei sintomi, storia di atopia. La scelta delle variabili è stata dettata dal grado di completezza dei dati da esse forniti ed in base alle nostre conoscenze sulla patologia studiata. Il numero dei cluster è stato stabilito sulla base dell'esito dell'esame del dendrogramma e delle statistiche CCC (cubic clustering criterion), pseudo F e pseudo t^2 ottenuti mediante l'applicazione del metodo gerarchico dei cluster [Poulsen, 2013].

Si è poi applicato il metodo delle k-medie per individuare i soggetti appartenenti a ciascuno dei cluster individuati. I cluster sono poi stati rappresentati graficamente attraverso la rappresentazione delle componenti relative all'analisi discriminante.

Le variabili sono poi state confrontate tra i cluster individuati con il test chi-quadrato nel caso di variabili categoriali e con il test di Kruskal-Wallis nel caso di variabili quantitative a distribuzione non normale verificata con il test di Shapiro-Wilk e con il test ANOVA nel caso di variabili quantitative a distribuzione normale.

Le analisi statistiche sono state condotte con il programma SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.) per Windows.

Per tutte le analisi statistiche sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0,05$.

B) Materiali e metodi dello studio sulla risposta infiammatoria delle vie aeree nell'asma da isocianati

Casistica

Dal 2012 al 2015 abbiamo reclutato 25 pazienti, 18 maschi e 7 femmine, afferiti nel nostro centro per sospetta asma professionale. Tutti i soggetti erano risultati esenti da infezioni respiratorie nel mese precedente gli accertamenti. Non avevano ricorso all'assunzione di steroidi per os nelle 4 settimane precedenti il ricovero o di steroidi inalatori e a broncodilatatori a lunga durata d'azione o ICS almeno nelle 24 ore precedenti lo studio. E' stata inoltre richiesta l'astensione da cibi o bevande, o dall'attività fisica intensa almeno nell'ora precedente la misurazione. Ogni soggetto ha disposto il proprio consenso informato all'esecuzione del test e lo studio è stato approvato dal comitato etico locale. Ciascuno è stato valutato per 5 giorni consecutivi. Nel primo giorno sono stati effettuati l'anamnesi generale ed occupazionale, l'esame obiettivo e le prove di funzionalità respiratoria (FEV1 e FVC, FEV1/FVC). Il giorno 2 si è svolto uno sham-test in cieco con placebo (ovvero con aria). Al termine dello sham test è stato eseguito un test di stimolazione bronchiale aspecifico con metacolina per valutare la reattività bronchiale basale, prima del test di esposizione specifico. Il terzo giorno i pazienti sono stati sottoposti al SIC con l'isocianato cui si sospettava fossero sensibilizzati sulla base delle schede tecniche fornite. Durante lo sham e durante il SIC, il FEV1 è stato monitorato ogni ora per 7 ore dall'inizio del test; il FeNO e i parametri flow-independent sono stati monitorati a 1, 3, 5, 7 ore dall'inizio del test. Nel quarto e nel quinto giorno si sono ripetute le misure del FEV, del FENO e dei valori dell'NO frazionato a 24 h dall'esecuzione del test di provocazione bronchiale specifico. Nel caso di diminuzione del FEV1 superiore al 20% del valore basale nel giorno dell'esposizione specifica i soggetti sono stati considerati positivi al SIC e il test con metacolina post esposizione specifica è stato eseguito il quarto giorno; nel caso di mancata risposta broncocostrittiva al test specifico (pazienti SIC negativi) il test con metacolina è stato effettuato nel terzo giorno, dopo 7 ore dall'esposizione specifica. I soggetti non sono rientrati a lavoro fino al termine dello studio.

Strumentazione utilizzata

[descrizioni aggiuntive rispetto a quelle del precedente capitolo A]

NO esalato frazionato

La misura è stata eseguita secondo le indicazioni ATS suddette (capitolo A, metodi). Per quanto riguarda la misura dell'NO esalato frazionato, si sono utilizzati cinque limitatori di flusso, per aiutare i pazienti a mantenere un flusso espiratorio costante: 10, 50, 100, 150, 250 ml/sec.

Lo strumento compiva automaticamente una calibrazione quotidiana con aria priva di NO. Per calcolare i parametri flow-independent è stata utilizzata la tecnica di Högman e Meriläinen [Högman et al, 2000; 2007; Högman M, Meriläinen P, Tsoukias NM, George SC. Noalvcalculations.print.xls; <http://www.rbmltd.co.il/admin/Uploads/217298.pdf>]. La conversione di Condorelli [Condorelli et al, 2007] è stata applicata a CaNO e JawNO per ottenere i valori dei parametri corretti per la diffusione assiale retrograda (rispettivamente CaNO corr e JawNO corr). In un nostro studio precedente la metodica è stata dimostrata essere adeguatamente ripetibile e riproducibile [Cattoni et al, 2013].

Misurazione dell'ADMA nell'EBC

La raccolta del condensato esalato è avvenuta secondo il metodo e la strumentazione descritti da Goldoni et al. facendo respirare il paziente per 15 minuti, a volume corrente, attaccato ad un boccaglio collegato ad un condensatore in grado di mantenere costante la temperatura di 55°C all'interno del tubo di raccolta dell'aria esalata [Goldoni, 2004]. Su questa matrice, simultaneamente sono state quantificate ADMA e tirosina e, visto che quest'ultima è considerata un buon metabolita per equilibrare la diluizione dell'ADMA nell'EBC, i dati sono stati espressi come ratio ADMA/Tyr.

Per tale analisi, applicando il metodo descritto da Di Gangi et al., è stato utilizzato uno strumento UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) accoppiato ad uno spettrometro di massa [Di Gangi, 2012]. La raccolta è stata condotta durante lo sham e durante il test specifico alla base, alla terza ora, alla settima ora ed a 24 ore dall'inizio della prova.

Misurazione dell'EBT

L'EBT è stato misurato tramite il dispositivo portatile X-Halo[®] (Delmedica, Singapore). Oltre alla temperatura finale calcolata dal device, è stato registrato anche il tempo necessario al raggiungimento della temperatura di equilibrio. Ai pazienti è stato pertanto chiesto di inalare attraverso il naso ed esalare attraverso la bocca direttamente nel boccaglio dello X-Halo, a volume corrente. Essi hanno respirato collegati al dispositivo finchè la centralina termica dello stesso non ha registrato un plateau. Ogni esalazione infatti aumenta la temperatura nel reservoir termico finchè non si raggiunge l'equilibrio. Il sensore di temperatura ha un'accuratezza di 0.03 °C. La misurazione è stata condotta durante lo sham e durante il test specifico alla base, alla terza ora, alla settima ora ed a 24 ore dall'inizio della prova.

Analisi statistica

I dati sono espressi come mediana e range interquartile (IQR) o come media $\pm$ errore standard (SE). Il confronto fra le variabili antropometriche e di base fra i 2 gruppi è stata condotta con Mann-Whitney test. La risposta al SIC è stata studiata comparando i valori di FeNO50 ed i parametri flow-independent fra sham ed esposizione specifica allo stesso time point in ciascun gruppo mediante Mann-Whitney test. L'analisi è stata condotta utilizzando il software Statview, version 5.0.1; SAS Institute Inc; Cary, NC è stato considerato significativo un valore di $p < 0.05$.

RISULTATI- PARTE A

Il campione dei 187 pazienti reclutati nello studio è risultato composto da soggetti con età media di 35 anni, non obesi ($BMI < 25$), prevalentemente non fumatori (101 pz; 54%), seguiti da ex fumatori e solo in piccola parte da fumatori ed in maggior parte maschi (132 pz; 70%). Un po' meno di 1/3 (52 pz; 28%) presentava una storia di atopia, la maggior parte di essi era esposta a TDI (151 pz; 80%) ed ha manifestato una risposta del tipo late al SIC (102 pz; 54%). Per quanto riguarda l'età media della prima esposizione e dell'esordio dei sintomi questa è risultata rispettivamente di 24 e 33 anni, con periodo di latenza medio pari a 8 anni. Tutti i valori sopra citati espressi come medie e SD vengono riassunti nella tabella 1 assieme ai valori di funzionalità respiratoria ed in particolare indice di Tiffeneau, FEV1 basale % del predetto e massimale % del predetto, PD20 pre e post test di provocazione bronchiale specifica (SIC), % di eosinofili e neutrofili a livello ematico e ai periodi di latenza e di persistenza dei sintomi prima della diagnosi.

Tab. 1: Casistica.

Caratteristiche dei soggetti	Valori
Età (aa)	35 (± 11)
Sesso (M/F)	132/55
BMI	24 (± 3.5)
Fumo (sì/no/ex)	27/101/59
IT base	79 (± 8)
FEV1 % predetto basale	100 (± 13)
FEV1 % predetto massimale	103 (± 13)
PD20 pre SIC (μg)	809 (± 573)
PD20 post SIC (μg)	471 (± 456)
Agente (TDI/MDI)	156/31
Tipo reazione (e/l/d)	38/102/47
Età d'esordio (aa)	33 (± 11)
Storia di atopia (si/no)	52/135
Eosinofili ematici (%)	3,9 ($\pm 2,8$)
Neutrofili ematici (%)	56 (± 11)
Età prima esposizione (aa)	24 (± 9)
Durata esposizione (aa)	11 (± 9)
Latenza	8 (± 8)
Anni sintomatico (prima della diagnosi)	3.4 (± 5)

In riferimento al primo scopo dello studio abbiamo selezionato 13 delle variabili a disposizione, escludendo anche questa volta le variabili per le quali dei dati risultavano mancanti o non di interesse per lo studio.

L'applicazione dell'analisi gerarchica dei cluster ci ha permesso di suddividere la nostra popolazione iniziale di 187 pazienti in un numero limitato di gruppi. Il numero più appropriato, ovvero 3, è stato stabilito sempre dal metodo analitico utilizzato ed in particolare dalle statistiche CCC (cubic clustering criterion), pseudo F e pseudo t^2 (Fig. 15) oltre che dall'osservazione del dendrogramma (Fig. 16).

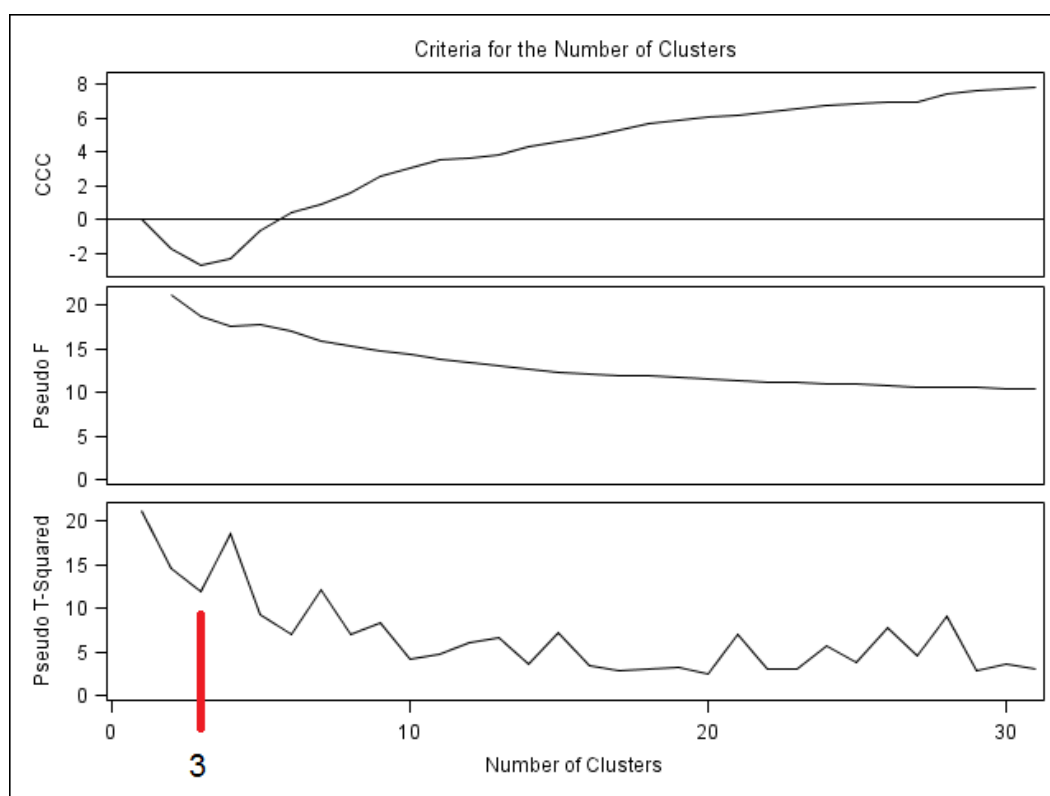


Fig. 15: Indicatori statistici del numero appropriato di cluster.

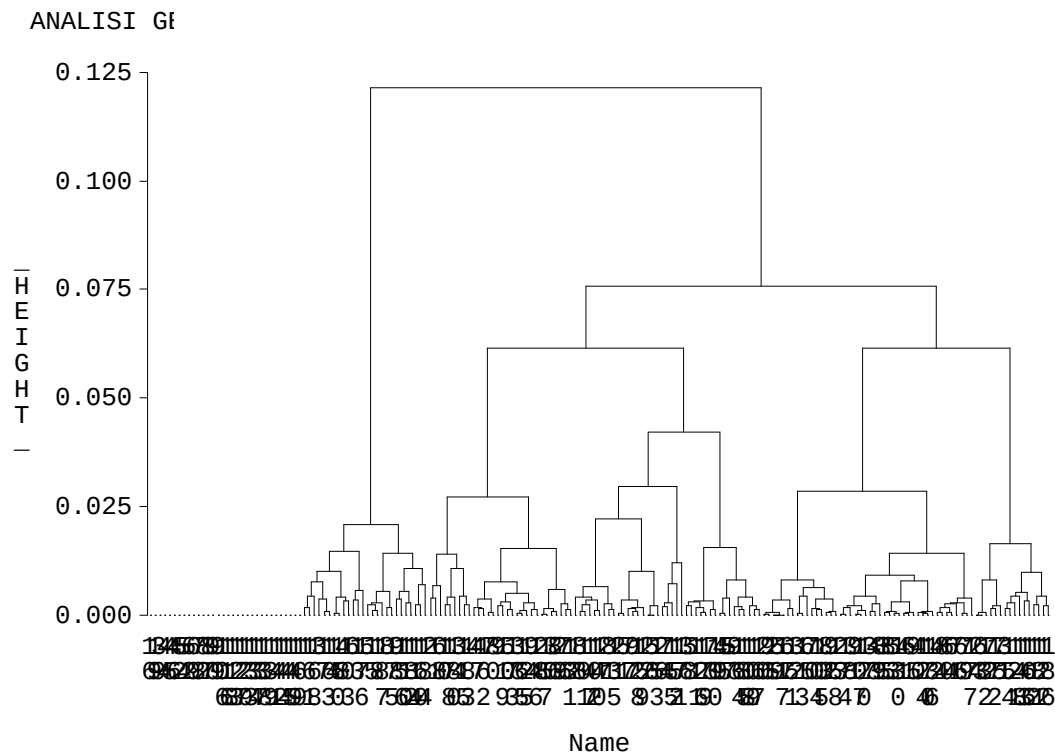


Fig. 16: Dendrogramma della suddivisione in cluster secondo il sistema gerarchico.

Ottenuta la suddivisione nei 3 cluster abbiamo verificato il tipo di distribuzione dei soggetti nei diversi cluster, considerando che solo 155 dei nostri pazienti sono stati inseriti all'interno degli stessi, in quanto 32 presentavano delle caratteristiche troppo discordanti e non uniformi ai gruppi formati per poter essere inseriti al loro interno. I cluster 1 e 2 sono risultati molto simili fra di loro in quanto a numerosità del campione, ovvero rispettivamente costituiti da 60 (38%) e 69 (45%) soggetti; il cluster 3 è risultato formato da meno della metà dei soggetti presenti negli altri 2 cluster, ovvero da 26 soggetti (17%) (Fig. 17).

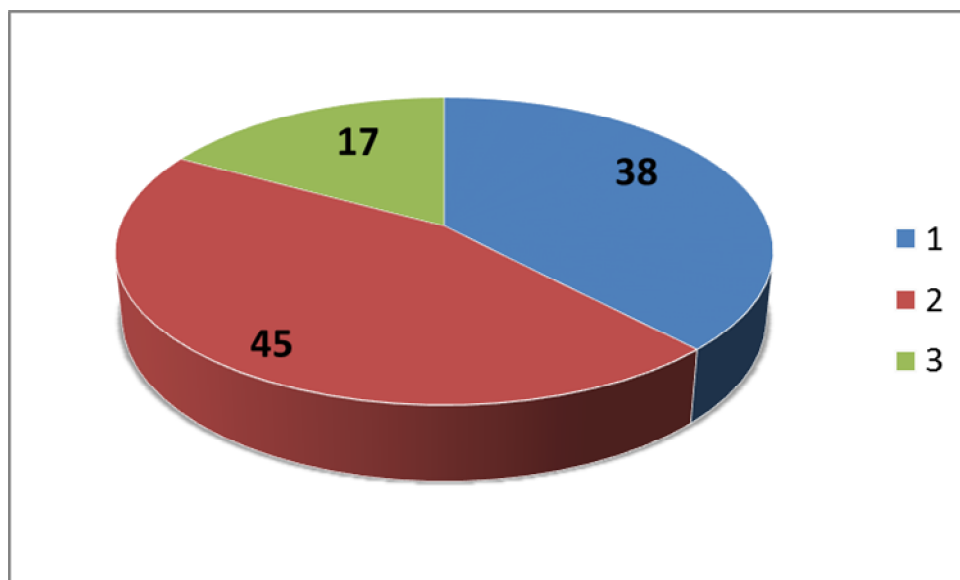


Fig. 17: Rappresentazione della suddivisione in cluster secondo il sistema gerarchico (valori percentuali).

La successiva analisi delle variabili (comprendenti quelle utilizzate per la suddivisione nei 3 cluster ed aggiungendo anche la PD20 post SIC, l'età alla prima esposizione, la durata totale dell'esposizione e la latenza), ha permesso di individuare nello specifico le caratteristiche che differenziano i soggetti appartenenti ai 3 cluster. Da rilevare come prima osservazione l'appartenenza di tutti i soggetti sensibilizzati ad MDI al cluster 3, ad esclusione di un unico soggetto appartenente al cluster 2; il cluster 1 e 2 sono risultati di conseguenza costituiti quasi esclusivamente da soggetti sensibilizzati a TDI. Dal punto di vista delle differenze statisticamente significative tra cluster da notare che il cluster 1 (in particolare messo a confronto col cluster 2) è costituito da soggetti più giovani alla diagnosi ma anche all'esordio dei sintomi, con minori valori di BMI, prevalentemente non fumatori, con una risposta al SIC prevalentemente di tipo late e con un quadro funzionale più conservato, per presenza di IT e FEV1% sul predetto basale più alto e una minore iperreattività bronchiale aspecifica. I soggetti del cluster 2 risultano quindi (rispetto al cluster 1) meno giovani sia alla diagnosi che all'esordio dei sintomi, con BMI maggiore, con quadro funzionale più compromesso in quanto aventi IT e FEV1 % del predetto basale più basso ed una maggiore iperreattività bronchiale aspecifica (anche nel confronto col cluster 3), con maggiore % di eosinofili a livello ematico (anche se non statisticamente significativa), prevalentemente ex fumatori e con risposta al SIC pressochè uniformemente distribuita fra early, late e dual.

Tab. 2: Caratteristiche dei soggetti, relative alle variabili utilizzate per stabilire l'appartenenza ai 3 diversi cluster, mediante l'analisi gerarchica dei cluster.

Caratteristiche Soggetti (155)	Cluster 1 60 (38%)	Cluster 2 69 (45%)	Cluster 3 26 (17%)	P
Età (aa)	32.1 (±9.8)	38.5 (±11.3)	37.4 (±9.2)	< 0.05
Sesso (M/F)	38/22	52/17	19/7	n.s.
BMI	23.4 (±3.5)	24.9 (±3.2)	24.7 (±4.3)	< 0.05
Fumo (sì/no/ex)	16/42/2	2/25/42	3/16/7	< 0.0001
IT base	83.9 (±6.9)	77.6 (±7.9)	77.2 (±9.7)	< 0.001
FEV1 % teorico base	106.4(±13.2)	98.8(±13.1)	96.2(±14)	< 0.05
PD20 pre SIC (µg)	929 (±543)	666 (±562)	896 (±576)	< 0.05
Agente (TDI/MDI)	60/0	68/1	0/26	< 0.001
Tipo reazione (e/l/d)	0/53/7	22/26/21	12/8/6	< 0.001
Atopia (sì/no)	16/44	22/47	5/21	n.s.
Eosinofili ematici (%)	3.3 (±1.8)	4.8 (±3.7)	3.4 (±1.9)	n.s.
Neutrofili ematici (%)	58.1 (±7.9)	55.0 (±10.1)	57.2 (±7.9)	n.s.
Età esordio (aa)	30.1 (±9.4)	35.3 (±11.7)	33.5 (±9.6)	< 0.05

Le variabili sesso, storia di atopia e % di eosinofili e neutrofili a livello ematico, non hanno mostrato una differenza statisticamente significativa nei 3 diversi cluster (Tab. 2). Infine anche le variabili non utilizzate per la suddivisione dei soggetti nei 3 diversi cluster, perché caratterizzate da una sostanziale mancanza di dati, quali PD20 post SIC, anni di esposizione, anni di latenza ed età alla prima esposizione, sono state analizzate ma non hanno mostrato una differenza statisticamente significativa fra i 3 cluster (Tab. 3).

Tab. 3: Caratteristiche dei soggetti, relative alle variabili non utilizzate per stabilire l'appartenenza ai 3 diversi cluster, mediante l'analisi gerarchica dei cluster.

Caratteristiche Soggetti (155)	Cluster 1 60 (38%)	Cluster 2 69 (45%)	Cluster 3 26 (17%)	P
PD20 post SIC (μg)	505 ($\pm$ 443)	476 ($\pm$ 478)	385 ($\pm$ 405)	n.s.
Inizio esposizione (aa)	23.4 ($\pm$ 9.4)	25.4 ($\pm$ 8.9)	27.5($\pm$ 9.2)	n.s.
Durata esposizione (aa)	9.6($\pm$ 9.3)	12.2 ($\pm$ 8.9)	9.3($\pm$ 6.4)	n.s.
Latenza (aa)	7.0($\pm$ 8.4)	8.1($\pm$ 8.7)	4.9($\pm$ 5.1)	n.s.

Successivamente al fine di non omettere i dati relativi a 32 pazienti, esclusi dal sistema di analisi gerarchico dei cluster, e considerando come più adatto al tipo di dati in nostro possesso (dati dispersi) il sistema di analisi della distanza delle medie, abbiamo ripetuto la stessa analisi con il secondo metodo.

Mediante l'applicazione dell'analisi multivariata delle k-medie e definendo a priori la suddivisione in 3 cluster dei soggetti affetti da asma professionale da isocianati abbiamo ottenuto la seguente fenotipizzazione (Fig. 18): cluster 1 (80 pz), cluster 2 (76 pz), cluster 3 (31).

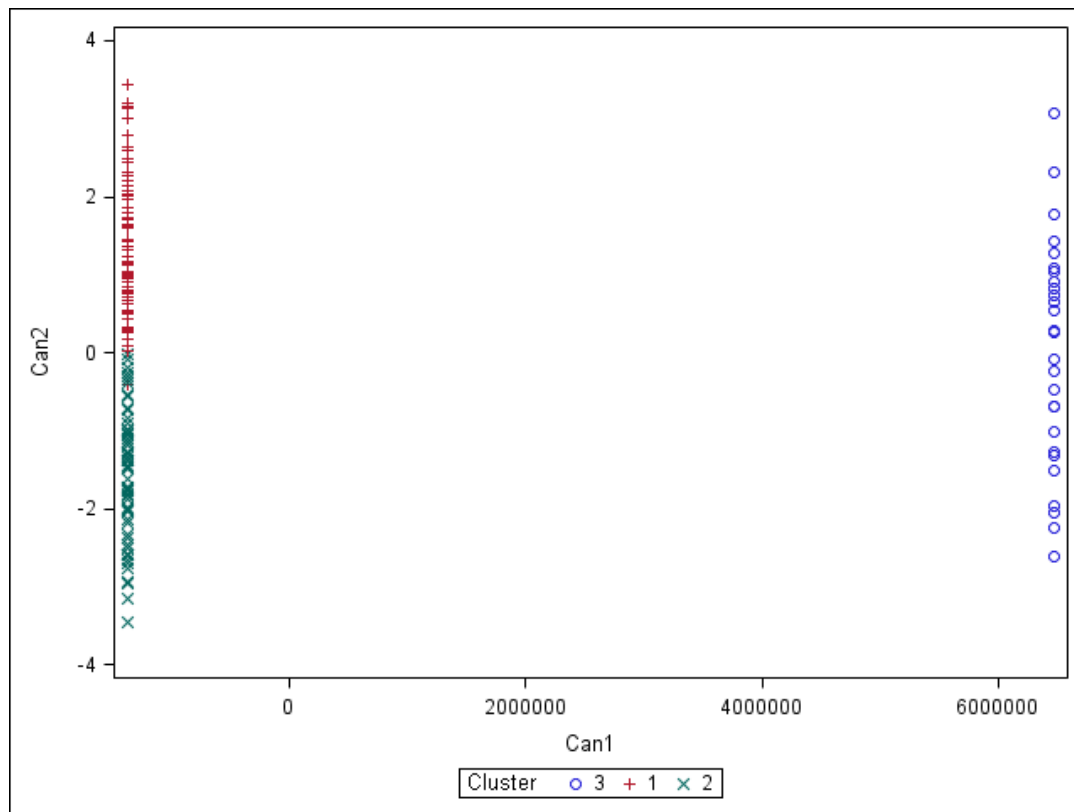


Fig. 18 Rappresentazione grafica della distribuzione nei tre cluster mediante il metodo delle k-medie

Le percentuali di distribuzione dei pazienti inclusi nei 3 cluster sono riportate in (Fig. 19).

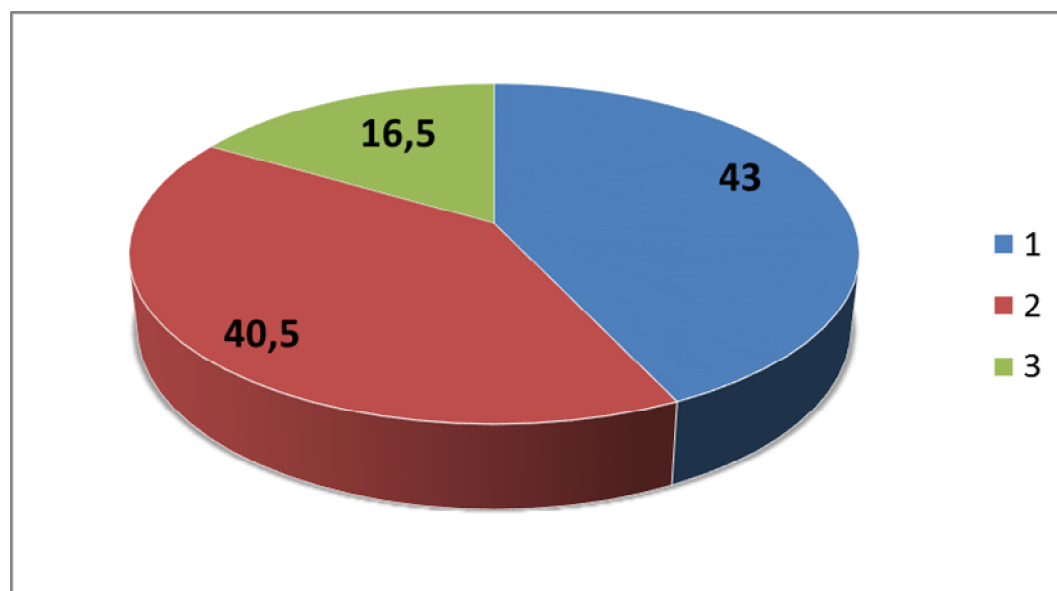


Fig.19: Rappresentazione della divisione in cluster, col metodo delle k-medie (valori percentuali).

In base alla nostra analisi il cluster meno rappresentato è risultato essere il 3, mentre i cluster 1 e 2 sono risultati costituiti da un numero simile di paziente, comunque per entrambi i cluster

più che doppio rispetto al cluster 3. Altra particolarità di rilievo è che tutti i soggetti classificati nel cluster 3 risultavano esposti in ambiente di lavoro e quindi sono stati esposti durante il SIC allo stesso tipo di isocianato, ovvero MDI (Fig. 20). Tutti i pazienti con asma professionale da isocianati MDI sembrerebbero costituire in base alle loro caratteristiche antropometriche, cliniche e funzionali un unico gruppo omogeneo, differenziandosi in maniera significativa dai pazienti con diagnosi di asma professionale da TDI. All'interno del cluster 3 inoltre prevale al contrario degli altri 2 cluster 1 risposta al SIC di tipo early (Fig. 21).

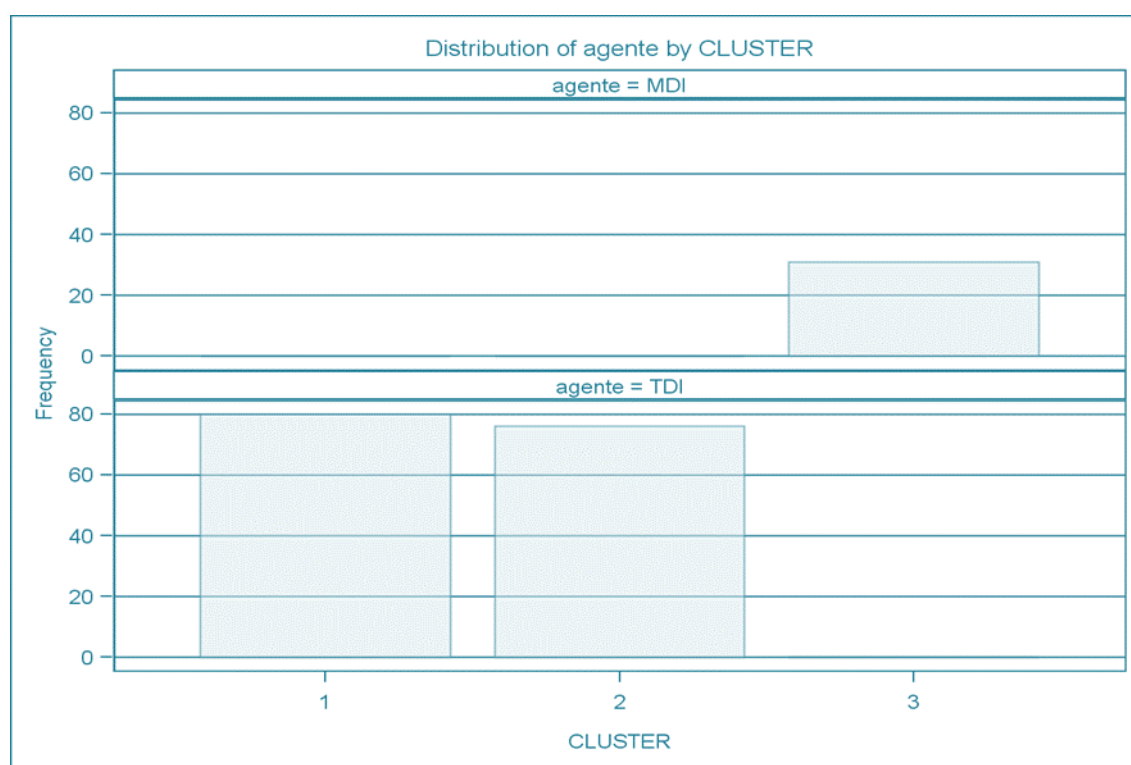


Fig. 20: Distribuzione dell'agente sensibilizzante nei 3 cluster.

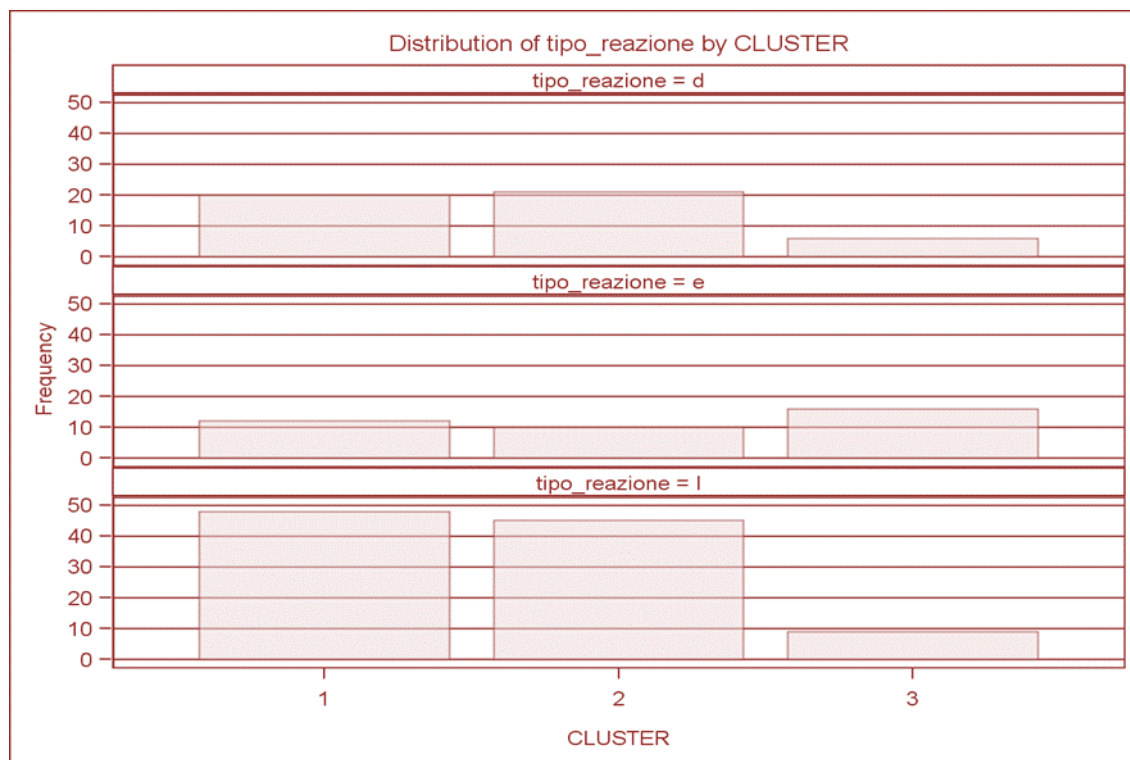


Fig. 21: Distribuzione del tipo di risposta al SIC nei 3 cluster.

I cluster 1 e 2 sono risultati costituiti esclusivamente da pazienti con asma professionale da isocianati TDI. I pazienti appartenenti ai due cluster presentano alcune similitudini quali sovrapponibile valori di PD20 basale, distribuzione del tipo di reazione al SIC (prevalentemente late), storia di atopia e % di eosinofili e neutrofili a livello ematico (Tab. 4). Le differenze fra i 2 cluster, statisticamente significative sono risultate invece l'età alla diagnosi e all'esordio dei sintomi respiratori, la distribuzione per sesso (donne sono in percentuale più rappresentate nel cluster 2), il BMI, la distribuzione in quanto abitudine al fumo in fumatori e non o ex fumatori, l'IT e il FEV1 % sul predetto basale. In particolare i pazienti del cluster 2 rispetto al cluster 1 sono risultati più giovani al momento della diagnosi di malattia, con valori più bassi di BMI, con una maggiore percentuale di donne e di pazienti non fumatori. Nel cluster 1 invece prevale la rappresentanza del sesso maschile e degli ex fumatori. Nonostante i valori relativi ad IT e FEV1 basale % del predetto, siano in entrambe i cluster nei limiti di norma, il quadro funzionale risulta migliore per i pazienti del cluster 2. Gli

stessi pazienti del cluster 2 risultano inoltre più giovani alla prima esposizione e presentano un periodo di esposizione ed un periodo di latenza fra inizio esposizione ed insorgenza dei sintomi più breve rispetto ai pazienti del cluster 1. L'analisi delle variabili non utilizzate per la classificazione dei pazienti nei 3 cluster ha mostrato inoltre come anche l'età di inizio esposizione, gli anni di latenza e la durata dell'esposizione si differenzino in maniera statisticamente significativa tra cluster 1 e 2. I pazienti del cluster 2 risultano infatti più giovani alla prima esposizione e presentano un periodo di esposizione ed un periodo di latenza fra inizio esposizione ed insorgenza dei sintomi più breve rispetto ai pazienti del cluster 1. Concordanti risultano invece i valori di PD20 sia pre che post SIC nei due cluster 1 e 2 (Tab. 5).

Tab. 4: Caratteristiche dei soggetti, relative alla variabili utilizzate per la determinazione dell'appartenenza ai 3 cluster, con metodo delle k-medie.

Caratteristiche Pazienti 187	Cluster 1 80 (43%)	Cluster 2 76 (40.5%)	Cluster 3 31 (16.5%)	P
Età (aa)	42.7(±8.3)	26.8 (±7.1)	37.2 (±9.5)	< 0.0001
Sesso (M/F)	66/14	42/34	24/7	< 0.05
BMI	25.8 (±3.3)	22.4 (±2.7)	24.9 (±4.0)	< 0.0001
Fumo (si/no/ex)	6/29/45	18/54/4	3/18/10	< 0.0001
IT base	75.7 (±6.3)	85.0 (±6.4)	76.3 (±10.1)	< 0.0001
FEV1 % teorico base	98.8 (±12.7)	106.6 (±13.8)	95.4 (±14.6)	< 0.05
PD20 pre SIC (µg)	793 (±583)	792 (±566)	896 (±576)	n.s.
Agente (TDI/MDI)	80/0	76/0	0/31	< 0.0001
Tipo reazione (e/l/d)	12/48/20	10/45/21	16/9/6	< 0.0001
Atopia (si/no)	28/52	16/60	8/23	n.s.
Eosinofili ematici (%)	3.6 (±2.1)	4.3 (±3.2)	3.8 (±3.4)	n.s.
Neutrofili ematici (%)	58.1 (±9.6)	55.3 (±8.2)	56.6 (±8.1)	n.s.
Età esordio (aa)	39.5 (±9.7)	25.4 (±6.6)	33.8 (±10.0)	< 0.0001

Tab. 5: Caratteristiche dei soggetti, relative alla variabili non utilizzate per la determinazione dell'appartenenza ai 3 cluster, con metodo delle k-medie.

Caratteristiche Pazienti 187	Cluster 1 80 (43%)	Cluster 2 76 (40.5%)	Cluster 3 31 (16.5%)	P
PD20 post SIC (µg)	512 (±504)	465 (±429)	383 (±394)	n.s.
Inizio esposizione (aa)	26.4 (±9.7)	20.1 (±6.2)	27.4 (±9.1)	< 0.0001
Durata esposizione (aa)	15.1 (±10.1)	7.2 (±5.7)	8.8 (±6.2)	< 0.0001
Latenza (aa)	11.3 (±10.2)	5.0 (±4.9)	4.8 (±5.0)	< 0.05

RISULTATI- Parte B

Sono riportate nella tabella 6 le caratteristiche antropometriche e di funzionalità respiratoria dei 25 soggetti arruolati nello studio, 18 maschi e 7 femmine, suddivisi in base all'esito del test di stimolazione bronchiale specifico in positivi e negativi al test (specific inhalation challenge, SIC). Le caratteristiche dei due gruppi sono risultate sovrapponibili, eccetto che per il FeNO50. Tutti i pazienti sono stati in grado di effettuare correttamente i test di funzionalità respiratoria, lo X-Halo, la raccolta dell'EBC e la misura dell'ossido nitrico frazionato.

Tabella 6: Caratteristiche dei soggetti.

	SIC-POSITIVI	SIC-NEGATIVI
Sesso, Maschio/Femmina	12/5	6/2
Età, anni	42.7±1.9	43±3.4
Fumo, non fumatore-ex fumatore/fumatore	14/3	6/2
Atopia, sì/no	5/12	2/6
BMI, kg/m²	24.4±0.8	27.1±1.1
FEV1, L	3.5±0.1	3.4±0.1
FEV1 % predetto	92.1±2.6	89.7±3.7
FEV1/FVC %	74±2	78±1
PD₂₀FEV1, mg	0.7±0.1	0.9±0.1
FeNO50, ppb	74.4±14.8 *	29.2±35.7
Isocianato testato, N°	10 TDI, 7 MDI	3 TDI, 3 HDI, 2 MDI
Tipo di reazione asmatica	6 EARLY, 2 DUAL, 9 LATE	-

I valori sono espressi come n° o media ± standard error; PD₂₀ : Dose Provocativa causale il 20% di caduta del FEV1; * p < 0.05 vs SIC-negativi

La tabella 7 riporta il time-course di FeNO50 e dei parametri flow-independent nei SIC-positivi (7a) e nei SIC-negativi (7b) durante il test specifico e lo sham. Nel gruppo dei SIC-positivi (tabella 7a) FeNO50 aumenta significativamente a 24 ore dal test (mediana 111.8 ppb [IQR, 167.5]; $p < 0.05$) se confrontato con lo sham (58.6 ppb [74.7]). I livelli di JawNO hanno manifestato il medesimo time-course con un incremento significativo post 24 ore dall'esposizione (6.6 nL/s [81]; $p < 0.05$) se confrontato con lo sham (3.3 nL/s [3.7]). Non sono state riscontrate significative variazioni negli altri parametri. Si è comunque rilevato un trend in aumento di CaNO a 24 ore dall'esposizione (5.2 ppb [6.9] vs sham 3.9 [2.7], $p > 0.05$).

Tabella 7a: Time course di FeNO50 e parametri flow-independent in pazienti con SIC positivo.

		Baseline	1 h	3 h	5H h	7 h	24 h
FeNO50 (ppb)	test	58.6 (74.7)	52.5 (63.7)	47 (52.9)	52.9 (55.4)	65.8 (68)	111.8 (167.5)*
	sham	51.2 (95)	47.7 (86.6)	50.4 (89.9)	38.8 (84)	43.6 (67)	58.6 (74.7)
CaNO (ppb)	test	209.5 (211.6)	162.1 (156.9)	123.1 (155.7)	149.8 (180.4)	220.5(177.2)	272.3 (298.5)
	sham	189.2 (238)	189.5 (278.7)	155.9 (211)	218.1 (185.4)	147.5(227.9)	209.5 (211.6)
DawNO (mL/s)	test	21.5 (9.1)	23.3 (13.7)	23.9 (15.4)	24 (13.5)	20.6 (17.4)	23.4 (16.5)
	sham	20.8 (10.4)	23.4 (16.4)	14.7 (22.6)	15.7 (23.3)	23.2 (21.5)	21.5 (9.1)
CaNO (ppb)	test	3.9 (2.7)	1.9 (4.6)	1.7 (3.6)	3.8 (5.5)	3.2 (6.3)	5.2 (6.9)
	sham	3.6 (4.6)	2.9 (2.6)	3.4 (2.6)	3.1 (3.5)	5 (4.4)	3.9 (2.7)
JawNO (nL/s)	test	3.3 (3.7)	2.7 (3.3)	2.4 (3.2)	2.7 (2.7)	3.9 (7.9)	6.6 (8.1) *
	sham	3.5 (6.4)	3.4 (5.6)	3.1 (6.1)	3.1 (7)	2 (4.3)	3.3 (3.7)

Dati espressi come mediana (IQR); * $p < 0.05$ vs sham

Nel gruppo dei SIC-negativi non è stata riscontrato alcun cambiamento di FeNO50 e dei parametri flow-independent (tabella 7b).

Tabella 7b: Time course di FeNO50 e parametri flow-independent in pazienti con SIC negativo.

		Baseline	1 h	3 h	5 h	7 h	24 h
FeNO50 (ppb)	test	17.6 (15.8)	18 (16.1)	16.5(15.7)	15.5 (18.5)	15.9 (11.9)	19.5 (14.7)
	sham	13.5 (8.6)	15.9 (12.8)	16.9 (9.7)	19.3 (4.4)	16.1 (10.2)	17.6 (15.8)
CawNO (ppb)	test	121.3 (103.6)	102.1(55.3)	72.7 (80)	62.8 (26.2)	74 (36.1)	70 (184)
	sham	93.5 (50.1)	90.7 (76.4)	65.2(30.6)	68.5 (25.2)	55 (30.8)	121.3(103.6)
DawNO (mL/s)	test	10 (12.8)	9.4 (12.2)	6.9 (9)	10.1 (8.7)	10.6 (12.8)	13.6 (15)
	sham	9.1 (5.5)	11.4 (3.8)	9.9 (7)	12.3 (9.1)	11.4 (11.9)	10 (12.8)
CaNO (ppb)	test	3.9 (4)	2.2 (2.2)	2.1 (0.7)	2.3 (1.9)	3.1 (2.4)	2.9 (4.1)
	sham	2.7 (0.7)	3.3 (1.3)	2.7 (0.4)	2.7 (1.8)	2.4 (2.8)	3.9 (4)
JawNO (nL/s)	test	0.7 (0.8)	0.7 (0.9)	0.7 (0.8)	0.7 (1.1)	0.7 (0.6)	0.7 (0.7)
	sham	0.5 (0.5)	0.7 (0.6)	0.7 (0.6)	0.8 (0.5)	0.7 (0.8)	0.7 (0.8)

Dati espressi come mediana (IQR)

L'applicazione della correzione assiale per la back-diffusion a JawNO e CaNO ha confermato in JawNO corr il significativo incremento durante il SIC nei soggetti SIC-positivi come illustrato in figura 22a (mediana alla base 5.6 nL/s [6.4] vs 24 h dopo SIC mediana 11.2 nL/s [13.9]; p <0.05). Non sono state documentate variazioni di JawNO corr nel gruppo dei SIC-negativi (figura 22b) e nemmeno di CaNO corr in entrambi i gruppi (figure 23a e 23b).

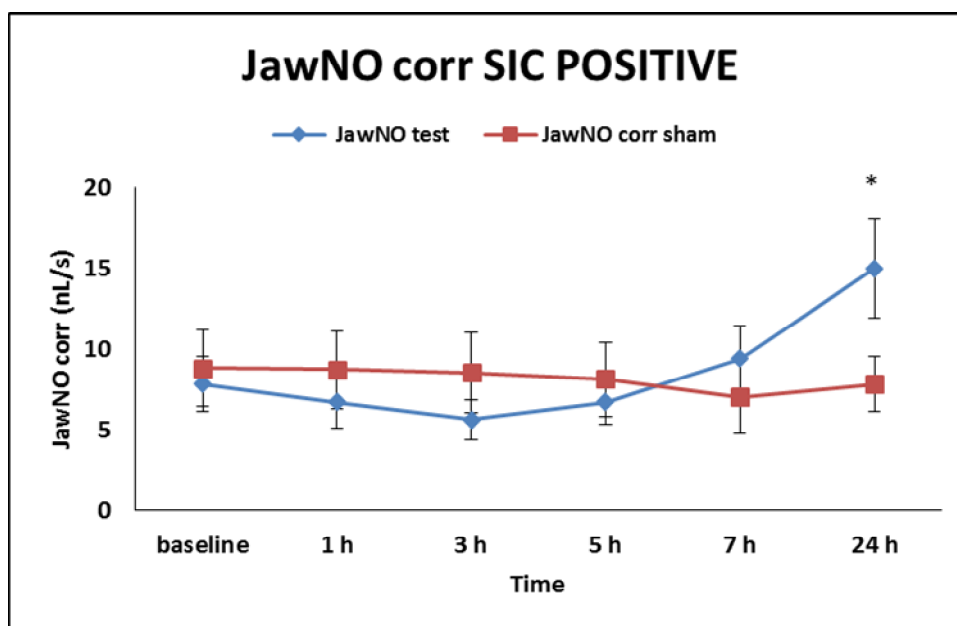


Fig. 22a

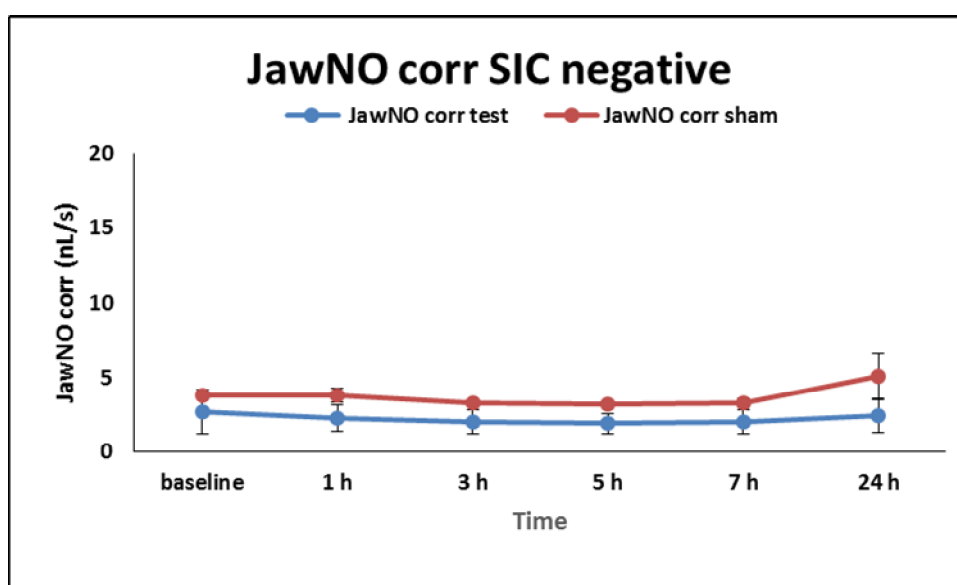


Fig. 22b

Figure 22: Time course di JawNO corr durante lo sham ed il test specifico nei SIC positive (18a) e SIC negativi (18b). I dati sono espressi come media $\pm$ SE

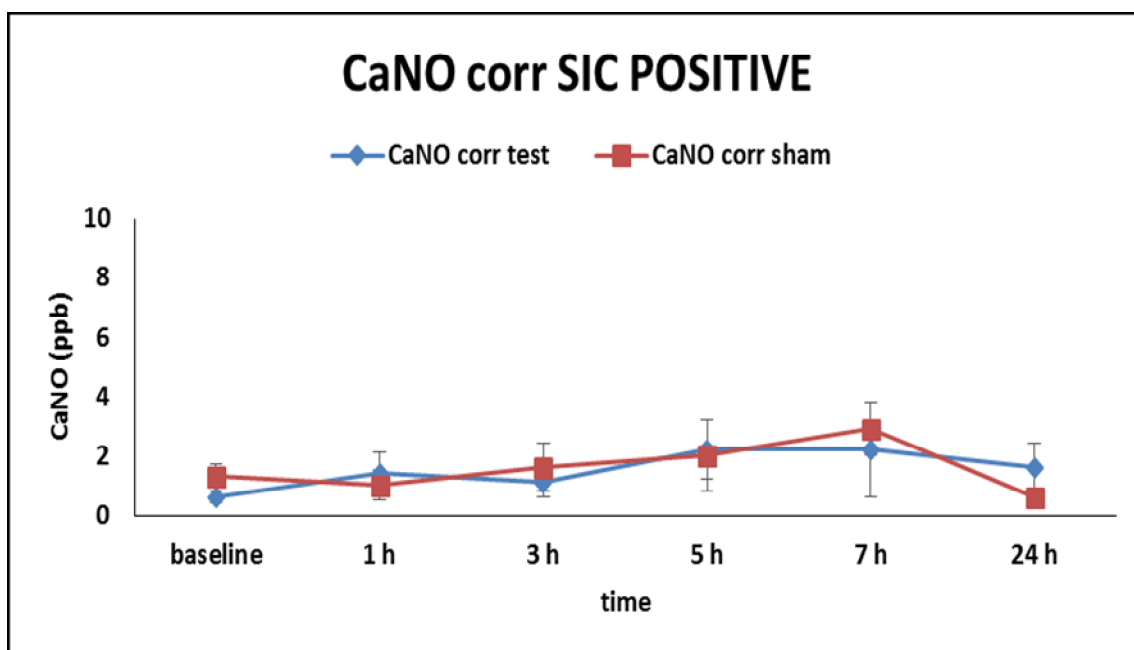


Fig. 23a

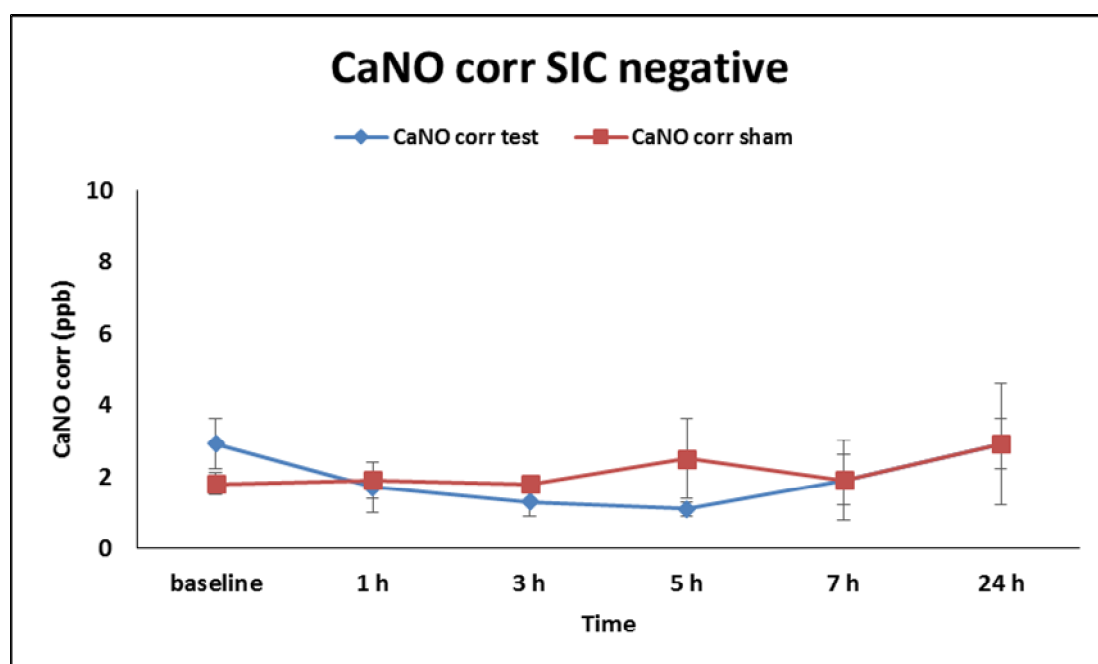


Fig. 23b

Figure 23: Time course di CaNO corr durante lo sham ed il test specifico nei SIC positive (23a) e SIC negativi (23b). I dati sono espressi come media $\pm$ SE.

Per verificare se i cambiamenti di FeNO50 e JawNO osservati nei SIC-positivi fossero correlate al pattern di broncoostruzione, abbiamo suddiviso i soggetti in base al tipo di risposta asmatica early (n= 6) e late o dual (n= 11) (Figure 24). Entrambi questi sotto gruppi hanno avuto un incremento sovrapponibile di FeNO50 (Fig. 24a) e JawNO (Fig. 24b) a 24 ore dal test, mentre per CaNO non ci sono state variazioni (Fig. 24c).

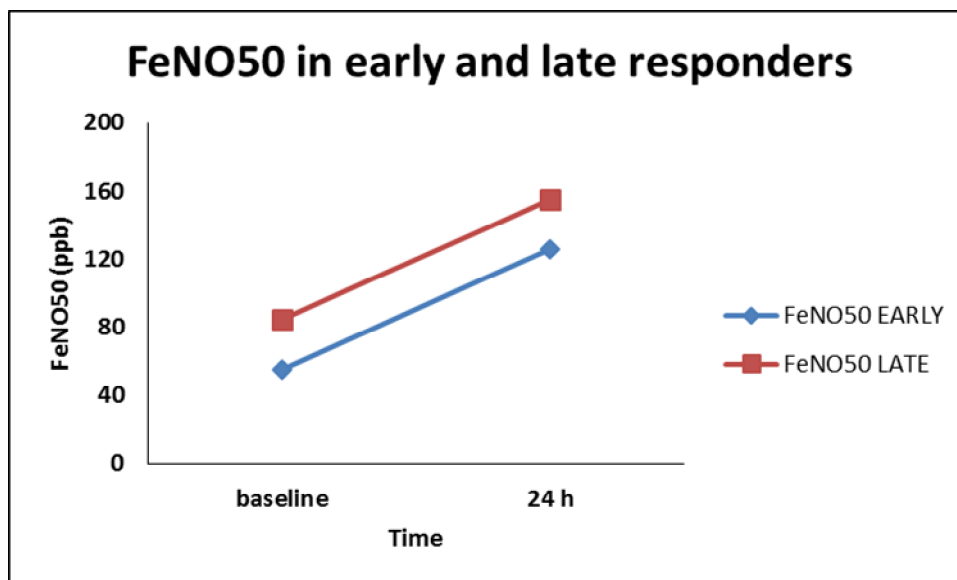


Fig. 24a

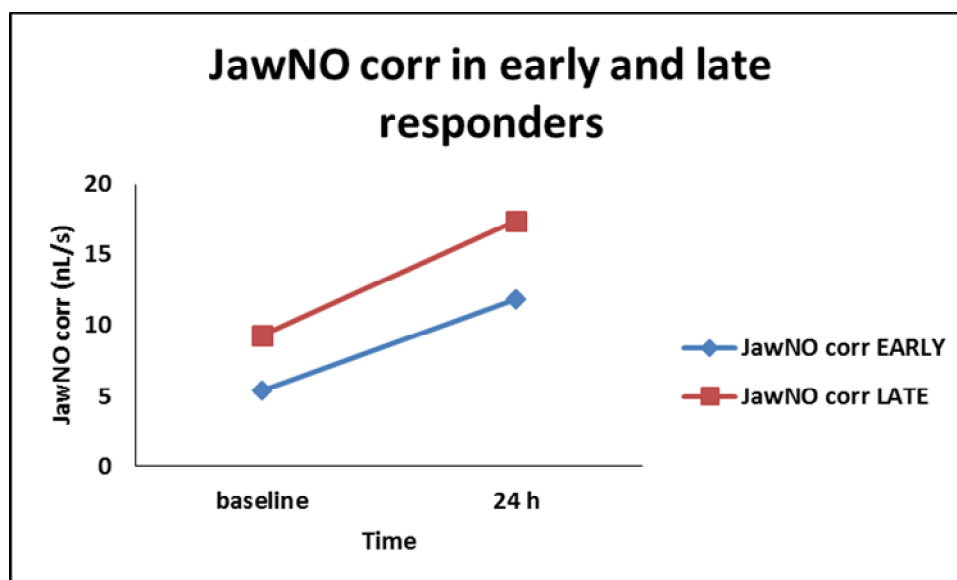


Fig. 24b

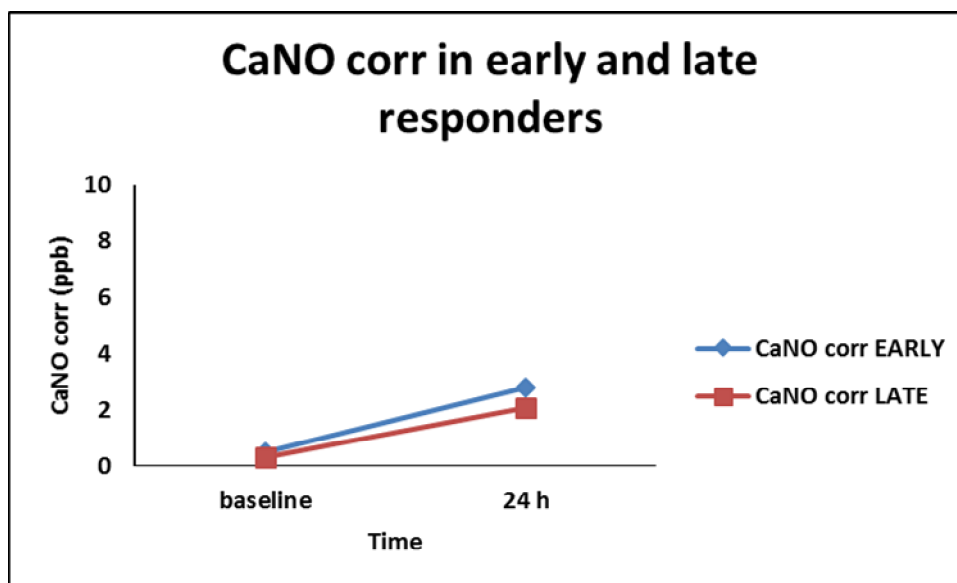


Fig. 24c

Figure 24: Variazioni di FeNO50 (24a), JawNO corr (24b) and CaNO corr (24c) intercorse fra il pre ed il post 24 ore dal test in soggetti con risposta al SIC di tipo early e late. I dati sono espressi come media $\pm$ SE.

Abbiamo confermato che l'incremento tardivo di FeNO50 e JawNO non è correlato all'entità della broncoostruzione visto che non si è rilevata una correlazione fra la percentuale di caduta tardiva del FEV1 dopo esposizione ad isocianati e le variazioni di FeNO50 e JawNO a 24 ore. Per verificare se il tipo di isocianato testato potesse aver influito sul time course del FeNO50 e dei parametri flow-independent, i soggetti esposti a TDI (n=10) e ad MDI (n=7) sono stati analizzati separatamente e non si è riscontrata alcuna differenza.

La tabella 8 riporta i dati relativi al ratio ADMA/Tyr nell'EBC dei SIC-positivi (n=9) e dei SIC-negativi (n=6). Non sono state riscontrate differenze significative fra i 2 gruppi ai diversi time-point.

Tabella 8: Time course del ratio ADMA/Tyr dopo esposizione ad isocianati nei SIC-positivi e SIC-negativi.

	Baseline	3 h	7 h	24 h
SIC-positivi	0.04 (0.07)	0.05 (0.09)	0.03 (0.08)	0.03 (0.07)
SIC-negativi	0.09 (0.08)	0.05 (0.08)	0.02 (0.02)	0.04 (0.09)

Dati espressi come mediana (IQR)

La tabella 9 riporta i dati relativi al monitoraggio dell'EBT dei SIC-positivi (n=8) e dei SIC-negativi (n=4). Non sono state riscontrate differenze significative fra i 2 gruppi ai diversi time-point.

Tabella 9: Time course dell'EBT dopo esposizione ad isocianati nei SIC-positivi e SIC-negativi.

	Baseline	3 h	7 h	24 h
SIC-positivi, °C	34.3 (3.3)	33.9 (3)	33.9 (3.5)	34 (3.2)
SIC-negativi, °C	33.9 (3.9)	33.4 (1.4)	33.7 (1.6)	33.8 (1.5)

Dati espressi come mediana (IQR)

DISCUSSIONE

L'utilizzo dell'analisi gerarchica dei cluster ci ha portati a stabilire che i nostri 187 pazienti non costituiscono un gruppo omogeneo ma possono essere suddivisi in 3 cluster. L'applicazione poi del metodo multivariato delle k-medie, su tre cluster, ci ha consentito di individuare due cluster di pazienti sensibilizzati a TDI con prevalente risposta late al SIC e un cluster di pazienti sensibilizzati a MDI con prevalente risposta early al SIC. I soggetti appartenenti ai due cluster dei TDI differiscono fra di loro in maniera significativa per l'età alla diagnosi e all'esordio dei sintomi respiratori, la distribuzione per sesso, il BMI, la distribuzione in quanto abitudine al fumo, l'IT, il FEV1 basale % del predetto, l'età di inizio esposizione, gli anni di latenza e la durata dell'esposizione.

L'asma può essere definita come una sindrome che si caratterizza per una certa variabilità nell'espressione della malattia e nella sua gravità [Wenzel et al, 2006; Haldar et al, 2008]. Fino ad oggi, per indicazioni date dal National Asthma Education and Prevention Program e dalle Global Initiative for Asthma Guidelines (GINA) l'approccio terapeutico è sempre stato stabilito in base alla gravità dell'asma. La stessa, sempre da linee guida, viene suddivisa in intermittente e persistente di grado da lieve a molto severo sulla base dei valori di funzionalità respiratoria ed in particolare del FEV1, dei sintomi diurni e notturni e dell'utilizzo di broncodilatatori [Bethesda et al, 2007; GINA, 2009]. Tale classificazione non tiene conto però di altre numerose variabili, che possono essere utilizzate in un'ulteriore subclassificazione dell'asma e quindi con lo scopo di caratterizzare in maniera ancora più specifica la malattia, stabilire con maggior precisione il rischio di esacerbazione e aiutare nella scelta del miglior approccio terapeutico. La stessa classificazione tradizionale dà per assodato che i pazienti con uno specifico livello di gravità di asma abbiano tutte le stesse caratteristiche cliniche e lo stesso rischio di esacerbazione della malattia e quindi concordemente a ciò dovrebbero seguire lo stesso regime terapeutico. Questo approccio tradizionale ignora quindi l'esistenza di sottotipi di asma all'interno del gruppo di asmatici definiti con la stessa gravità di malattia.

La fenotipizzazione dei soggetti con asma professionale da isocianati, eseguita con analisi multivariata delle k-medie, conferma l'eterogeneità della malattia e la possibilità di suddividere i soggetti in un numero di cluster pari a tre. Il cluster 3, che è anche quello meno rappresentato, è formato da soggetti sensibilizzati ad MDI, con tipo di risposta al SIC prevalentemente early e con caratteristiche antropometriche, cliniche e funzionali intermedie

rispetto a quelle degli altri due cluster. Tutti gli altri soggetti, sensibilizzati a TDI, si dividono pressochè equamente nei cluster 1 e 2 e presentano importanti differenze sul piano antropometrico, clinico e funzionale. I lavoratori del cluster 1, prevalentemente di sesso maschile, BMI più elevato, ex fumatori e che risultano esposti meno precocemente in ambiente di lavoro all'agente asmogeno, hanno una durata di esposizione all'agente stesso maggiore dei soggetti del cluster 2, così come la latenza fra inizio esposizione ed esordio dei sintomi respiratorio (più che doppia rispetto al cluster 1). Prendendo poi in considerazione l'età di insorgenza dei sintomi e l'età alla diagnosi si nota come anche il periodo di persistenza della sintomatologia prima della prima diagnosi sia maggiore (più che doppio) nel cluster 1 rispetto al 2. L'esposizione meno precoce in pazienti con le caratteristiche sopra citate sembrerebbe posticipare l'instaurarsi della sensibilizzazione all'agente e la comparsa della patologia respiratoria. D'altra parte il quadro funzionale del cluster 1 risulta più compromesso di quello del cluster 2, con valori più bassi relativamente ad IT e FEV1 % del predetto basale, pur in presenza di una PD20 quasi sovrapponibile al test di iperreattività bronchiale aspecifica.

I soggetti del cluster 2 oltre ad iniziare più precocemente l'esposizione hanno una durata di esposizione ma anche dei periodi di latenza e di persistenza della sintomatologia prima della diagnosi più brevi. In particolare quest'ultimo dato potrebbe giustificare la migliore conservazione del quadro funzionale.

Infine nella fenotipizzazione dei pazienti con asma professionale da isocianati non risultano rilevanti variabili come il grado di iperreattività bronchiale aspecifica, la storia di atopia e la percentuale a livello ematico di eosinofili e neutrofili. Tale risultato è in linea con quanto noto a riguardo della patogenesi di questo tipo di asma per il quale l'atopia non gioca un ruolo predisponente.

Difficile risulta un confronto tra i nostri dati e quelli ottenuti da uno studio di Sava e Lemièrre [SAVA et al, Poster Board 205] che per primi hanno applicato il sistema di analisi multivariata ad un gruppo di pazienti affetti da asma correlata al lavoro. La difficoltà di confronto sta nel fatto che sono stati presi in considerazione anche soggetti con asma correlata al lavoro, ma non professionale, in quanto non dimostrata dal SIC. Fra i pazienti affetti da asma professionale sono stati inclusi quelli sensibilizzati ad agenti sia ad alto che a basso peso molecolare, arrivando ad una distinzione in 3 cluster, di cui due rappresentati da soggetti esposti ad agenti a basso peso molecolare (fra cui si presume anche gli isocianati). Le variabili poi che si differenziano in maniera significativa tra i pazienti appartenenti ai 2 cluster di asma

professionale indotta da agenti a basso peso molecolare sono solo in parte coincidenti con quelle utilizzate nel nostro studio. Fondamentalmente Sava e coll. hanno identificato un cluster di maschi, con reazione di tipo ritardata al SIC e bassa % di atopia e di rinite occupazionale e un altro cluster costituito prevalentemente da donne, con quadro di malattia più severo, minore calo medio del FEV1 con l'esposizione all'agente ed un maggior cambiamento nell'iperreattività bronchiale aspecifica. Le uniche osservazioni che possono essere fatte sono quelle relative all'assenza, nel nostro studio rispetto a quello di Sava, di una distinzione così netta fra i cluster in base alla distribuzione dei due sessi e di variazioni dell'iperreattività bronchiale aspecifica.

Il nostro risulta quindi il primo che ha portato a classificare in più cluster, mediante l'applicazione di un'analisi multivariata, una popolazione apparentemente omogenea di pazienti affetti da asma professionale da isocianati.

La fenotipizzazione da noi ottenuta potrebbe aiutarci in una maggiore comprensione dei meccanismi immunopatogenetici che stanno alla base dell'asma da isocianati e quindi indirizzarci ad una migliore e più precisa classificazione della malattia al fine di migliorarne il controllo attraverso un approccio più personalizzato ed identificando i rischi individuali. Tale classificazione potrebbe inoltre fornire importanti informazioni riguardanti la differente prognosi dei pazienti appartenenti ai diversi cluster. Sono sicuramente necessari ulteriori studi finalizzati a tale obiettivo, che vadano a prendere in considerazione altre variabili quali il tipo di terapia utilizzata, il dosaggio, la risposta alla stessa e parametri di infiammazione come la concentrazione di NO esalato ed altri marcatori dosabili a livello ematico, nell'espettorato indotto, nel condensato esalato e nel tessuto ottenuto da biopsie bronchiali. Tra le variabili da noi raccolte si ritrovano anche valori di NO esalato e % di eosinofili a livello dell'espettorato indotto, ma relativamente ad un numero troppo esiguo di pazienti e quindi tali variabili non sono state utilizzate nella nostra analisi. Variabili che invece altri autori come Haldar e coll. hanno utilizzato al fine della classificazione in cluster dei pazienti asmatici assieme ad altri dati correlati fondamentalmente al quadro clinico ed individuando più cluster che si differenziano fra di loro per il grado di concordanza tra quadro di infiammazione eosinofila e quadro sintomatologico [Haldar et al, 2008]. Con questa fenotipizzazione l'autore ha definito 5 diversi cluster meritevoli di un diverso approccio nella diagnosi, nel follow-up e nella determinazione della terapia più adeguata (mentre in alcuni cluster al fine della prescrizione di un adeguato trattamento terapeutico è sufficiente la raccolta dei sintomi riferiti dal paziente, in altri cluster è fondamentale invece lo studio dei marcatori di infiammazione e

infine in ulteriori due cluster lo studio dei marcatori di infiammazione risulta insufficiente e inadeguato).

Un'ulteriore variabile non analizzata nel nostro studio a causa della mancanza di dati disponibili é quella relativa alle IgE specifiche. Uno studio di Pezzini condotto in soggetti esposti a isocianati aveva mostrato come tra i soggetti esposti a MDI, con storia di esposizione massiva, con risposta di tipo early al SIC e con insorgenza precoce dei sintomi (non oltre i 6 anni dalla prima esposizione) ben l'83% presentasse IgE specifiche a fronte di un 27% per i lavoratori esposti a TDI [Pezzini et al, 1984].

A completamento del nostro studio sarebbe di indubbia utilità avere a disposizione i dati riguardanti le stesse variabili analizzate per la formazione dei cluster ricavate però nel follow-up eseguito a distanza di anni dalla diagnosi negli stessi pazienti, al fine di stabilire la persistenza o meno della suddivisione negli stessi cluster e della permanenza o meno dei singoli soggetti all'interno del cluster di origine. Buona parte di suddetti dati è stata già raccolta e si procederà pertanto con lo studio quanto prima. Tale analisi è già stata eseguita da Boudier e coll. Nell'asma comune. Essi hanno indagato, mediante uno studio longitudinale, le differenze nella suddivisione in cluster di una popolazione 3320 asmatici, al tempo zero e nel follow-up eseguito a 10 anni dalla prima valutazione notando che i fenotipi osservati a distanza di 10 anni presentavano forte similitudine con quelli ritrovati al tempo zero, o meglio la probabilità di ritrovare un individuo all'interno dello stesso cluster al tempo zero e nel follow-up a 10 anni, variava dal 54 all'88%. La transizione più importante da un cluster all'altro si è visto essere dettata da una variazione negli anni di alcuni asmatici nella sintomatologia, in particolare nei fenotipi comprendenti soggetti non atopici rispetto agli atopici [Boudier et al, 2013]. Naturalmente tale analisi, nella nostra popolazione di soggetti affetti da asma professionale, risulterebbe fortemente condizionata dall'allontanamento del lavoratore dall'agente sensibilizzante, che è l'elemento più rilevante per una prognosi favorevole della malattia. Tuttavia con i dati attuali in nostro possesso non è possibile stabilire se l'allontanamento dall'agente garantisca lo stesso tipo di prognosi nei soggetti appartenenti a cluster differenti. Per tale motivo sono necessari ulteriori studi con dati ottenuti dal follow-up nel tempo degli stessi pazienti.

D'altro canto bisogna ricordare che non tutti gli autori sono convinti dell'utilità della creazione di diversi fenotipi. Lewontin infatti dichiara come la definizione di fenotipo clinico non segua criteri oggettivi ma sia intrinsecamente dipendente dal contesto analizzato e dalle variabili che l'osservatore ritiene importanti ai fini della spiegazione del fenomeno descritto

(context sensitive) e come sia, almeno in parte, variabile nel tempo e dipendente dall'evoluzione clinica e dal paziente (time sensitive) [Lewontin, 2004]. Secondo altri la definizione di fenotipo in termini molecolari per quanto sia un metodo oggettivo non consente attualmente una fenotipizzazione univoca dei soggetti e offre una descrizione iper semplificata e riduzionista del fenotipo [Brasier, 2008]. Infine mettendo a confronto genotipo e fenotipo si è visto che mentre il fenotipo è intrinsecamente variabile, il genotipo è relativamente stabile. Inoltre mentre il genoma è stato completamente sequenziato, la completa descrizione del fenotipo non è attualmente possibile e il livello fenotipico è intrinsecamente complesso ed è analizzato a diversi livelli di organizzazione molecolare, cellulare, di tessuto, di organo e di collettività [Lewontin, 2004].

Nella seconda parte del nostro studio relativo al profilo infiammatorio dell'asma professionale abbiamo dimostrato che l'incremento tardivo di FeNO₅₀, associato alla reazione asmatica indotta da isocianati, è dovuto a cambiamenti delle dinamiche dell'NO a livello di vie aeree e non nel compartimento alveolare. Questo incremento è spiegato da un aumento di flusso di NO dalla parete bronchiale al lume (JawNO), mentre la capacità di diffusione di NO nelle vie aeree non si modifica. Le variazioni nelle dinamiche dell'NO sono specifiche dei soggetti sensibilizzati ad isocianati e che hanno riportato una risposta positiva al SIC ma sono indipendenti dal pattern (early o late) e dall'entità della broncoostruzione. Abbiamo inoltre dimostrato che né le concentrazioni di ADMA nell'EBC né la temperatura delle vie aeree aumentano a seguito del processo infiammatorio indotto.

In base al principio di Fick, JawNO dipende dalla differenza di concentrazione fra l'NO nella parete bronchiale (CawNO) ed il lume, e dalla capacità di diffusione dell'NO (DawNO). In questo studio non abbiamo osservato alcun cambiamento di DawNO. Si è visto invece un trend in aumento di CawNO a 24 ore dopo il SIC nei soggetti sensibilizzati anche se non statisticamente significativo. Questi riscontri sono correlabili ad un'iperproduzione di NO nelle vie aeree. Tale interpretazione è suffragata da precedenti osservazioni di una up-regulation di iNOS nel corso di processi infiammatori [Barnes, 2010] ed al fatto che nelle reazioni asmatiche indotte da isocianati si sia dimostrato un afflusso di cellule infiammatorie nelle vie aeree, specialmente di eosinofili [Ferrazzoni, 2009; Maestrelli, 1994; Swierczyńska-Machura, 2008; Lemièrè, 2001].

Purtroppo il profilo infiammatorio dell'espettorato indotto, ed in particolare un ampio pannello citochinico Th1 e Th2 che ci si era prefissi di studiare, non è stato analizzato in quanto i campioni validi pre e post SIC erano insufficienti per un'adeguata misurazione.

Non sono state rilevate variazioni di NO dopo lo sham nei SIC-positivi o dopo il test specifico nei soggetti non sensibilizzati. Ne consegue che quanto riscontrato in merito all'NO sia specifico per gli individui sensibilizzati agli isocianati che hanno sviluppato una reazione allergica. Nonostante ci potesse essere una ragione nel considerare che parte dell'NO esalato potesse essere di origine alveolare noi abbiamo sconferto tale ipotesi. Il CaNO non è differito significativamente fra i due gruppi dopo l'esposizione ad isocianati tenendo in conto dell'effetto della diffusione assiale retrograda dell'NO dalle vie aeree prossimali a quelle distali contro la direzione dell'espiazione. C'è stato comunque un trend in aumento di CaNO, riscontrato nei SIC-positivi a 24 ore dal test specifico e scomparso quando i valori sono stati corretti per la diffusione assiale retrograda a dimostrazione del fatto che la produzione bronchiale di NO è un determinante della concentrazione alveolare di NO [Kerckx, 2008]. Queste osservazioni sono in linea con i riscontri di precedenti studi relativi all'asma acuta. Gelb et al hanno descritto un incremento di JawNO e CaNO nelle esacerbazioni asmatiche [Gelb, 2010]. Comunque dopo la correzione di Condorelli il CaNO risultava sovrapponibile a quello dei controlli sani. Brindicci et al hanno riscontrato un aumento di JawNO e CaNO nel corso delle riesacerbazioni asmatiche in pazienti con malattia di grado moderato-grave ma in quel caso non è stata applicata poi la correzione per la back-diffusion [Brindicci, 2007]. Ci sono pochi studi relativi alle dinamiche NO nel corso di SIC occupazionale. La maggior parte degli studi nell'asma indotta da isocianati ha documentato un aumento del FeNO50 a 24-48 ore dal SIC risultato positivo [Ferrazzoni, 2009; Swierczyńska-Machura, 2008; Pedrosa, 2012; Sastre 2013, Piipari, 2002]. E peraltro il time-course del FeNO50 nel corso del SIC con isocianati nei soggetti sensibilizzati è sovrapponibile a quello osservato in soggetti asmatici atopici, dopo il SIC con gli allergeni specifici [Ricciardolo, 2003; Haccuria, 2014]. Non ci sono studi precedenti che abbiano studiato la localizzazione della produzione di NO nelle reazioni asmatiche indotte dai soli isocianati. Il FeNO50 ed il CaNO sono stati studiati da Haccuria et al nel corso di test specifici nell'asma atopica. La conclusione che il processo infiammatorio indotto dagli allergeni fosse confinato alle vie aeree di conduzione e non al compartimento alveolare, è in linea con il nostro riscontro relativo all'asma occupazionale indotta da isocianati [Haccuria, 2014]. È noto che le reazioni asmatiche tardive, sia quelle indotte da allergeni comuni sia quelle dovute ad isocianati, si associno ad una maggior e risposta infiammatoria piuttosto che le reazioni asmatiche isolate di tipo early [Fabbri, 1991;

Yoshida, 2005]. I nostri dati non confermano questo assunto quando la produzione di NO venga usata come surrogato dell'infiammazione delle vie aeree. Infatti le variazioni di JawNO e FeNO50 sono sovrapponibili fra early e late responders. A conferma del fatto che la broncoostruzione e l'infiammazione delle vie aeree sono dissociate vi è l'assenza di correlazione fra l'entità delle variazioni di FEV1 e l'entità dell'aumento di JawNO e FeNO50 nei SIC-positivi. Il nostro ed altri gruppi hanno dimostrato un effetto del calibro delle vie aeree sull'NO esalato [Cattoni, 2013; Piacentini, 2002; Verbanck, 2008]. In linea con queste osservazioni, i riscontri di Haccuria et al indicano che i valori dei FeNO50 misurati nel corso del SIC con sensibilizzanti nell'asma allergica integrano sia l'infiammazione delle vie aeree che la funzionalità respiratoria. Nel nostro studio si può escludere un'interferenza del calibro delle vie aeree in quanto le variazioni FeNO50 e JawNO sono state riscontrate a 24 ore, quando il FEV1 era tornato ai valori basali.

Il polmone rappresenta la maggiore fonte di ADMA, una molecola che potrebbe essere coinvolta nella fisiopatologia delle malattie respiratorie. Nelle cellule epiteliali murine si è visto che elevate concentrazioni di ADMA determinano un'inattivazione dell'NO sintetasi inducendo un decremento di sintesi di NO e promuovendo la formazione di superossido e perossinitrito [Wells, 2007]. I dati relativi all'ADMA nell'asma, in umano, sono pochi. Carraro et al hanno riscontrato livelli di ADMA nell'EBC dei bambini asmatici più elevati che nei controlli sani, senza differenze correlate all'uso di corticosteroidi inalatori [Carraro, 2013]. Nel sangue periferico i livelli di ADMA non differiscono fra pazienti pediatrici con e senza asma [Lau, 2013]. Negli adulti con asma grave invece i livelli di ADMA sono stati riscontrati maggiori che nei soggetti con forma di malattia lieve-moderata [Lara, 2008]. Data l'interferenza dell'ADMA con la produzione di NO ed i precedenti riscontri di un aumento di ADMA dopo il test specifico con allergeni [Scott, 2014], si è ritenuto di procedere ad una misurazione dell'ADMA nel corso del nostro studio anche al fine di indagare ulteriormente le dinamiche dell'NO durante i SIC. L'assenza di differenze di concentrazione di ADMA fra i SIC positivi ed i SIC negativi fa supporre che l'ADMA non abbia un ruolo rilevante nelle variazioni di NO indotte da isocianati. Nonostante il ridotto numero di soggetti, data la sovrapposizione dei dati dell'ADMA fra i due gruppi ad ogni time-point, siamo piuttosto certi che questo riscontro sia solido.

Come già detto l'asma è una malattia infiammatoria delle vie aeree. All'esame istologico della parete bronchiale è stato ampiamente documentato un incremento della vascolarizzazione e del flusso sanguigno bronchiale [Carroll, 1997; Li, 1997; Kumar, 1998].

Questi cambiamenti contribuiscono alla regolazione della temperatura delle vie aeree ed al tono muscolare [Gilbert, 1992]. Svitati mediatori dell'infiammazione coinvolti nell'asma possono promuovere la vasodilatazione bronchiale. Un ruolo chiave lo ricopre l'NO, come vasodilatatore bronchiale ed aumentando il flusso ematico bronchiale. Paredi et al. nel 2002 ipotizzarono pertanto che nei pazienti asmatici, date le alte concentrazioni di NO che li caratterizzano, si dovesse riscontrare un incremento della temperatura dell'aria espirata (EBT). In tale occasione veniva per la prima volta effettuata la misurazione dell'EBT in 34 soggetti, 18 asmatici e 16 controlli sani. Lo studio riscontrava un più rapido aumento dell'EBT durante un singolo espiro negli asmatici rispetto ai sani e questo correlava all'aumentata concentrazione di NO esalato dai pazienti affetti da asma. Si documentava inoltre una debole correlazione negativa fra la quota di incremento dell'EBT e la broncoostruzione determinata misurando il FEV1. Questo veniva spiegato da una riduzione del calibro delle vie aeree causata dall'aumento della vascolarizzazione e del flusso ematico bronchiale; ipotesi supportata anche dal riscontro in pazienti con asma grave di un aumento di vascolarizzazione delle vie aeree rispetto ai soggetti con forme lievi-moderate [Paredi, 2002; Carroll, 1997; Li, 1997].

L'attività di iNOS è dipendente dalla temperatura quindi elevate temperature nelle vie aeree dei pazienti asmatici possono indurre un'ulteriore sintesi di NO [Venturini, 1999]. Uno studio del 2007 [Piacentini, 2007] confermava il riscontro di Paredi et al. L'EBT dei bambini asmatici era infatti significativamente maggiore che nei controlli sani e correlava positivamente sia col FeNO che con la percentuale di eosinofili nell'espettorato indotto. Nel considerare l'EBT come un marker non invasivo surrogato dell'infiammazione delle vie aeree, Xepapadaki et al. hanno indagato eventuali differenze fra l'EBT di bambini in fase di asma controllata ed in periodi di esacerbazioni indotte da virus ed ne hanno riscontrato un aumento proprio nel corso di eventi infettivi se confrontato con l'EBT di non asmatici incorsi in infezione virale [Xepapadaki, 2010]. Sempre in un gruppo di bambini asmatici è stato condotto uno studio pilota volto a verificare la possibile correlazione fra la concentrazione di metalloproteinasi-9 (MMP-9, considerata un mediatore dell'infiammazione delle vie aeree e del rimodellamento nell'asma) nel surnatante dell'espettorato indotto e l'EBT. La correlazione fra questi due dati risultava positiva e veniva spiegata come la risultante della stretta relazione fra il rimodellamento e la vascolarizzazione tipiche dell'asma [Piacentini, 2008]. In 100 adulti asmatici e 50 volontari sani García et al. hanno invece valutato se vi fosse un incremento dell'EBT in soggetti con asma non controllata. Veniva osservato un aumento dell'EBT statisticamente significativo in questi ultimi rispetto agli asmatici ben controllati ed

ai controlli sani, concludendo che l'EBT si potesse ritenere un valido indicatore dello stato infiammatorio delle vie aeree nell'asma [García 2013].

Dati i suddetti riscontri nell'asma comune e la correlazione positiva fra l'aumento della temperatura delle vie aeree e della concentrazione di NO esalato abbiamo proceduto alla misurazione dell'EBT in un campione di soggetti. L'assenza di differenze di valori di EBT nei SIC positivi e SIC negativi fa supporre che i meccanismi implicati nello sviluppo di asma professionale siano diversi da quelli comune e che non sia pertanto possibile considerare l'EBT come un marker surrogato dell'infiammazione delle vie aeree nell'OA da isocianati.

Il nostro studio ha svariati punti di forza. In primis, il disegno include multipli controlli, rappresentati dall'esposizione allo sham in pazienti sensibilizzati e l'esposizione attiva nei soggetti non sensibilizzati. È stata esclusa l'interferenza della terapia inalatoria cortisonica sull'infiammazione delle vie aeree e sull'attività dell'NO sintetasi giacché i pazienti non assumevano corticosteroidi da almeno 4 settimane. Abbiamo inoltre monitorato l'andamento dell'NO per un tempo adeguato. Inoltre il fatto di aver studiato una risposta infiammatoria indotta da un solo tipo di agente sensibilizzante ha evitato bias inerenti a degli stimoli che potrebbero agire tramite meccanismi diversi ed ha eliminato l'influenza dell'esposizione ambientale (gli isocianati sono presenti infatti solo in processi lavorativi e non ubiquitari). La concentrazione di isocianati utilizzata durante i SIC in cabina di esposizione (10 ± 3 ppb) è ampiamente inferiore al limite dell'ACGIH adottato per le esposizioni short-term (20 ppb) [ACGIH, 2002]. Possiamo pertanto escludere che siano stati provocati effetti semplicemente irritativi nel corso del nostro setting sperimentale.

In conclusione questa seconda parte dello studio ha contribuito all'interpretazione del FeNO nel corso dei SIC con isocianati e probabilmente i nostri riscontri potrebbero essere estesi ai SIC con allergeni o con altri sensibilizzanti occupazionali. Dato che in questo modello sperimentale, l'incremento di NO è stato pressoché esclusivamente determinato dall'incremento di JawNo, l'uso di FeNO50 risulta essere adeguato per monitorare la risposta dell'NO esalato nel corso del SIC in soggetti sensibilizzati, senza ricorrere all'uso della più complicata e lunga metodica multi-flusso.

CONCLUSIONI

L'asma da isocianati è una patologia eterogenea come l'asma comune. Gli elementi principali che differenziano i cluster di asma professionale da isocianati sono l'agente sensibilizzante e il tipo di risposta al SIC (cluster 3 vs cluster 1 e 2).

Anche nell'ambito dell'asma indotta dallo stesso agente (TDI) si sono evidenziati due cluster in cui quello con peggiore funzionalità respiratoria è rappresentato da soggetti più anziani alla diagnosi e con maggiore durata dell'esposizione.

I motivi per cui l'asma occupazionale risulta essere eterogenea possono essere un differente meccanismo d'azione dei monomeri o una diversa suscettibilità degli individui appartenenti ai diversi cluster sia in termini di insorgenza della malattia sia in termini di evoluzione della stessa.

Abbiamo inoltre documentato nel corso dei SIC un aumento di FeNO50 dovuto esclusivamente ad un aumentato flusso di NO dalla parete bronchiale al lume. Questo studio ha dimostrato che la misurazione del FeNO50 nel corso del SIC può fornire informazioni aggiuntive al monitoraggio funzionale spirometrico, anche perché la broncoostruzione e la risposta infiammatoria delle vie aeree si sono rivelate dissociate. L'assetto infiammatorio delle vie aeree nel corso del SIC non si caratterizza nei soggetti sensibilizzati ad isocianati né con incremento dell'ADMA né con incremento dell'EBT.

I nostri dati contribuiscono quindi a rafforzare la posizione dell' "ERS Task Force sui SIC occupazionali" che suggerisce che la misurazione del FeNO costituisca un supporto nell'interpretazione delle risposte dei SIC quando le variazioni di FEV1 siano dubbie [Vandenplas, 2014].

Bibliografia

AMEILLE J, LABRANOIS A, DESCATHA A et al. Epidemiology and aetiological agents of occupational asthma. *Rev Mal Respir.* 2006;23:726-740.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH) Worldwide. Threshold Limit Values for chemical substances and physical agents in the work environment. Cincinnati, OH: ACGIH Worldwide; 2002.

ATS/ERS Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:2104-2117.

ATS/ERS Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:912-930.

ANDERSON G.P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet.* 2008;372:1107–1119.

ARCHER S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 1993;7:349-360.

ASANO K, CHEE CB, GASTON B et al. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:10089-10093.

BARBINOVA L, BAUR X. Increase in exhaled nitric oxide (eNO) after work-related isocyanate exposure. *Int Arch Occup Environ Health.* 2006;79:387–395.

BARNES PJ, BELVISI MG. Nitric oxide and lung disease *Thorax.* 1993;48:1034-1043.

BAUR X, MAREK W, AMMON J et al. Respiratory and other hazards of isocyanates. *Int Arch Occup Environ Health*. 1994;66:141-152.

BELVISI MG, STRETTON CD, BARNES PJ. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter or bronchodilator nerves in human airway. *Eur Pharmacol J*. 1992;210:221-222.

BERNSTEIN IL, BERNSTEIN DI, CHAN-YEUNG M et al. Definition and classification of asthma in the workplace. New York, Marcel Dekker; 1993, pp 1-4.

BERNSTEIN JA. Overview of diisocyanate occupational asthma. *Toxicology*. 1996;111:181-189.

BETHESDA MD. National Asthma Education and Prevention Program. Expert panel report 3: guidelines for the diagnosis and management of asthma.: National Institutes of Health; National Heart, Lung, and Blood Institute; 2007. Publication no. 07-4051 [accessed June 8, 2009]. Available from: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma>

BJERMER L, ALVING K, DIAMANT Z et al. Current evidence and future research needs for FeNO measurement in respiratory Diseases. *Respiratory Medicine*. 2014;108:830-841.

BOOT JD, TARASEVYCH S, STERK PJ et al. Reversal of the late asthmatic response increases exhaled nitric oxide. *Respir Med*. 2005;99:1591-1594.

BORISH L, CULP JA. Asthma: a syndrome composed of heterogeneous diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;101:1-8.

BOUDIER A, CURJURIC I, BASAGAÑA X et al. Ten-year follow-up of cluster-based asthma phenotypes in adults. A pooled analysis of three cohorts. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:550-560.

BRASIER AR, VICTOR S, BOETTICHER G et al. Molecular phenotyping of severe asthma using pattern recognition of bronchoalveolar lavage-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:30-37.

BREMNER CG, DEMEESTER TR, OBER C et al. Rethinking genetic models of asthma: the role of environmental-modifiers. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:670-678.

BRINDICCI C, ITO K, BARNES PJ et al. Differential flow analysis of exhaled nitric oxide in patients with asthma of differing severity. *Chest*. 2007;131:1353-1362.

BRUNN G, HEY C, WESSLER I et al. Endogenous nitric oxide inhibits leukotriene B4 release from rat alveolar macrophages. *Eur J Pharmacol*. 1997;326:53-60.

BUCHER JR, URAIH LC, HILDEBRANDT PK et al. Carcinogenicity and pulmonary pathology associated with a single 2 hours inhalation exposure of laboratory rodents to methylisocyanate. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81:1586-1587.

BULAU P, ZAKRZEWICZ D, KITOWSKA K et al. Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292:L18-24.

BUTLER AR, FLITNEY FW, WILLIAMS DL. Nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16: 18-22.

CARPAGNANO GE, LACEDONIA D, SPANEVELLO A et al. Is the exhaled breath temperature in lung cancer influenced by airways angiogenesis or by inflammation? *Med Oncol*. 2015;32:237.

CARRARO S, GIORDANO G, PIACENTINI G et al. Asymmetric dimethylarginine in exhaled breath condensate and serum of children with asthma. *Chest*. 2013;144:405-410.

CARRARO S, PIACENTINI G, LUSIANI M et al. Exhaled air temperature in children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Pulmonol*. 2010;45:1240-1245.

CARROLL NG, COOKE C, JAMES AL. Bronchial blood vessel dimensions in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:689-695.

CARROLL NG, MUTAVDZIC S, JAMES AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2002;19:879-85.

CATTONI I, GUARNIERI G, TOSETTO A et al. Mechanisms of decrease in fractional exhaled nitric oxide during acute bronchoconstriction. *Chest*. 2013;143:1269-1276.

CHAN-YEUNG M. Occupational asthma. *Environ Health Perspect*. 1995;103:249-252.

COLEMAN JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* 2002;129:4-10.

CONDORELLI P, GEORGE SC. Free nitric oxide diffusion in the bronchial microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283: H2660–H2670.

CONDORELLI P, SHIN HW, ALEDIA AS et al. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. *J Appl Physiol*. 2007;102:417-425.

CORRADI M, GERGELOVA P, GOLDONI M et al. Exhaled Nitric Oxide in Occupational Respiratory Medicine and Environmental Health: State of Art. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2011;41:1–23.

CORRADI M, SANCHEZ M. DEL M, ACAMPA O et al. Non-invasive assessment of lung pathobiology in hairdressers. *Med Lav*. 2008;99:49–57.

COTE' J, KENNEDY S, CHAN-YEUNG M. Sensitivity and specificity of PC20 and peak respiratory flow rate in cedar asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;85:592-598.

DE GOUW HW, GRUNBERG K, SCHOT R et al. Relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness following experimental rinovirus infection in asthmatic subjects. *Eur Respir J*. 1998;11:126-132.

DE GOUW HW, HENDRIKS J, WOLTMAN AM et al. Exhaled nitric oxide (NO) is reduced shortly after bronchoconstriction to direct and indirect stimuli in asthma. *Am J Respir Clin Care Med.* 1998;158:315-319.

DI GANGI IM, PIRILLO P, CARRARO S et al. Online trapping and enrichment ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for sensitive measurement of "arginine-asymmetric dimethylarginine cycle" biomarkers in human exhaled breath condensate. *Anal Chim Acta.* 2012;754:67-74.

DWEIK RA, BOGGS PB, ERZURUM SC et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FeNO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:602-615.

EDITORIAL. A plea to abandon asthma as a disease concept. *Lancet.* 368, 705 (2006).

FABBRI LM, MAESTRELLI P, SAETTA M et al. Airway inflammation during late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. *Am Rev Respir Dis.* 1991;143:S37-S38.

FABBRI LM, ROMAGNOLI M, CORBETTA L. Differences in airway inflammation in patients with fixed air flow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:418-424

FERRAZZONI S, SCARPA MC, GUARNIERI G et al. Exhaled nitric oxide and breath condensate pH in asthmatic reactions induced by isocyanates. *Chest.* 2009; 136:155–162.

FLORENTIN A, ACOUETÉY DS, REMEN T, PENVEN E, THAON I, ZMIROU-NAVIER D, PARIS C. Exhaled nitric oxide and screening for occupational asthma in two at-risk sectors: bakery and hairdressing. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014;18:744–750.

GARCÍA G, BERGNA M, URIBE E et al. Increased exhaled breath temperature in subjects with controlled asthma. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17:969-972.

GARNIER P, FAJAC I, DESSANGES JF et al. Exhaled nitric oxide during acute changes of airway calibre in asthma. *Eur Respir J.* 1996;9:1134-1138.

GAUTHIER M, RAY A, WENZEL S. Evolving concepts of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:660-668.

GELB AF, GEORGE SC, SILKOFF PE et al. Central and peripheral airway/alveolar sites of exhaled nitric oxide in acute asthma. *Thorax*. 2010;65:619-625.

GIBSON PG, SIMPSON JL, HANKIN R et al. Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax*. 2003;58:116–121.

GILBERT IA, FOUKE JM, MCFADDEN ERJ. Heat and water flux in the intrathoracic airways and exercise-induced asthma. *J Appl Physiol*. 1987;63:1681-1691.

GILBERT IA, MCFADDEN ERJ. Airway cooling and rewarming: the second reaction sequence in exercise induced asthma. *J Clin Invest*. 1992;90:699-704.

GINA (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION). National Institutes of Health; National Heart, Lung, and Blood Institute. Available at <http://www.ginasthma.org>.

GOLDONI M, CATALANI S, DE PALMA G et al. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect* 2004;112:1293–1298.

GRISHAM MB, JOURD’HEUIL D, WINK DA. Nitric oxide: physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999;276:315-321.

GUARNIERI G, CATTONI I, BARBETTA G et al. Caratteristiche dell’asma professionale nei lavoratori migranti nell’Italia settentrionale: studio osservazionale nel periodo 1987-2011. *G Ital Med Lav Erg*. 2011;33:142-156.

GUO FH, De RAEVE HR, RICE TW et al. Continuous nitric oxide synthase by inducible nitric oxide synthase in normal human air way epithelium in vivo. *Proct Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:7809-7813.

GUSTAFSSON LE, LEONE AM, PERSSON MG et al. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181:852–857.

HACCURIA A, MICHILS A, MICHIELS S et al. Exhaled nitric oxide: a biomarker integrating both lung function and airway inflammation changes. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:554-559.

HALDAR P, PAVORD ID, SHAW D et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178: 218–224.

HAMILL L, FERRIS K, KAPANDE K et al. Exhaled breath temperature measurement and asthma control in children prescribed inhaled corticosteroids: a cross sectional study. *Paediatr Pulmonol.* 2016;51:13-21.

HEEDERIK D, HENNEBERGER PK, REDLICH CA. Primary prevention: exposure reduction, skin exposure and respiratory protection. *Eur Respir Rev.* 2012;21:112-124.

HENNEBERGER PK, DEPREZ RD, ASDIGIAN N et al. Workplace exacerbation of asthma symptoms: findings from population-based study in Maine. *Arch Environ Health.* 2003;58:781-788.

HENNEBERGER PK, DERK S, SAMA SR et al. The frequency of workplace exacerbation among health maintenance organisation members with asthma. *Occup Environ Med.* 2006;132:29s-55s.

HO LP, WOOD FT, ROBSON A et al. Atopy influences exhaled nitric oxide levels in adult asthmatics. *Chest* 2000;118:1327-1331.

HO LP, WOOD FT, ROBSON A, INNES JA, GREENING AP. The current single exhalation method of measuring exhaled nitric oxide is affected by airway calibre. *Eur Respir J* 2000; 15:1009-1013

HÖGMAN M, DRCA N, EHRSTEDT C et al. Exhaled nitric oxide partitioned into alveolar, lower airways and nasal contributions. *Respir Med*. 2000;94:985-991.

HÖGMAN M, HOLMKVIST T, WEGENER T et al. Extended NO analysis applied to patients with COPD, allergic asthma and allergic rhinitis. *Resp Med*. 2002;96:24-30 .

HÖGMAN M, LAFIH J, MERILAINEN P et al. Extended NO analysis in a healthy subgroup of a random sample from a Swedish population. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2009;29:18–23.

HÖGMAN M, MALINOVSKI A, NORBACK D et al. Added value with extended NO analysis in atopy and asthma. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2011;31:294–299.

HÖGMAN M, MERILÄINEN P, TSOUKIAS NM, GEORGE SC. Noalvcalculations.print.xls;<http://www.rbmltd.co.il/admin/Uploads/217298.pdf>.

HÖGMAN M, MERILÄINEN P. Extended NO analysis in asthma. *J Breath Res*. 2007;1:024001

HÖGMANN M, STROMBERG S, SCHEDIN U et al. Nitric oxide from the human respiratory tract efficiently quantified by standardized single breath measurement. *Acta Physiol Scand*. 1997; 159:345-346.

HUMBERT M. et al. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and non atopic asthma: evidence against “intrinsic” asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1497–1504.

KAISER GL, MOTTRAM C. L’ossido nitrico esalato e le sue frazioni nella pratica della medicina respiratoria. *CHEST Ediz Ital*. 2008;2:33-42.

KERCKX Y, MICHILS A, VAN MUYLEM A. Airway contribution to alveolar nitric oxide in healthy subjects and stable asthma patients. *J Appl Physiol*. 2008;104:918-924.

KERCKX Y, VAN MUYLEM A. Axial distribution heterogeneity of nitric oxide airway production in healthy adults. *J Appl Physiol*. 2009;106:1832–1839.

KHARATINOV SA, BARNES PJ. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J*. 2000; 16:781-792.

KHARITONOV SA, O'CONNOR BJ, BARNES PJ. Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1894-1899.

KHARITONOV SA, YATES D, BARNES PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J*. 1995;8:295-297.

KHARITONOV SA, YATES D, ROBBINS RA, LOGAN-SINCLAIR R et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994;343:133-135.

KHARITONOV SA, YATES D, SPRINGALL DR et al. Exhaled nitric oxide is increased in asthma. *Chest*. 1995;107:156-157

KLEINERT H, BOISSEL JP, SCHWARTZ PM. Regulation of the expression of nitric oxide synthase isoforms. In: *Nitric oxide: Biology and pathobiology*. Eds: LJ Ignarro, Academic Press, San Diego, 2000, pp 105-128.

KLEINERT H, EUCHENHOFER C, IHRIG-BIEDERT I et al. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol*. 1996;49:15-21.

KOBZIK L, BREDT DS, LOWENSTEIN CJ et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;9:371-377.

KOGEVINAS M, ZOCK JP, JARVISD et al. Exposure to substances in the workplace and new-onset asthma: an international prospective population-based study (ECRHS-II). *Lancet*. 2007;370:336-341.

KUMAR SD, EMERY MJ, ATKINS ND et al. Airway mucosal blood flow in bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:153-156.

LANE C, KNIGHT D, BURGESS S, FRANKLIN P, HORAK F, LEGG J, MOELLER A, STICK S. Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath. *Thorax* 2004; 59:757-760.

LARA A, KHATRI SB, WANG Z et al.; National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. Alterations of the arginine metabolome in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:673-681.

LATZA U, BAUR X. Occupational obstructive airway diseases in Germany: frequency and causes in an international comparison. *Am J Ind Med*. 2005;48:144-152.

LAU EM, MORGAN PE, BELOUSOVA EG et al. Asymmetric dimethylarginine and asthma: results from the Childhood Asthma Prevention Study. *Eur Respir J*. 2013;41:1234-1237.

LEE MS. Oxidative conversion of isothiocyanates to isocyanates by rat liver. *Environ Health Perspect*. 1994;102:115-118.

LEHTIMÄKI L, KANKAANRANTA H, SAARELAINEN S et al. Extended exhaled NO measurement differentiates between alveolar and bronchial inflammation. *Am J Respir Clin Care Med*. 2001;163:1557-1561.

LEMIÈRE C, D'ALPAOS V, CHABOILLEZ S et al. Investigation of occupational asthma sputum cell counts or exhaled nitric oxide? *Chest*. 2010; 137:617–622.

LEMIÈRE C, NGUYEN S, SAVA F et al. Occupational asthma phenotypes identified by increased fractional exhaled nitric oxide after exposure to causal agents. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 134:1063-1067.

LEMIÈRE C. Induced sputum and exhaled nitric oxide as non-invasive markers of airway inflammation from work exposures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:133–137.

LEWONTIN RC. The Genotype/Phenotype Distinction. Stanford Encyclopedia of Philosophy. First published Fri Jan 23, 2004; substantive revision Tue Apr 26, 2011.

LI X, WILSON JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:229-233

LOMBARDO L, BALMES JR. Linee guida per il trattamento, la prevenzione e la gestione dell'asma nell'adulto. 2008 (GINA); <http://www.ginasma.it>. Occupational asthma: a review. *Environ Health Perspect*. 2000;108:697-704.

LÖTVALL, J. et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:355–360.

LUNDBERG JON, WEITZBERG E, LUNDBERG JM, ALVING K. Nitric oxide in exhaled air. *Eur Respir J*. 1996;9:2671-2680.

MAESTRELLI P, BOSCHETTO P, FABBRI LM et al. Mechanisms of occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;3:531-542.

MAESTRELLI P, CALCAGNI PG, SAETTA M et al. Sputum eosinophilia after asthmatic responses induced by isocyanates in sensitized subjects. *Clin Exp Allergy*. 1994;24:29-34.

MAESTRELLI P, DEL PRETE GF, DE CARLI M et al. CD8 T-cell clones producing interleukin-5 and interferon-gamma in bronchial mucosa of patients with asthma induced by toluene diisocyanate. *Scand J Work Environ Health*. 1994;20:376-381.

MAESTRELLI P, FABBRI LM, MALO JL. Occupational allergy in Holgate ST Church MK, Lichtenstein LM (Eds), *Allergy*, 3rd ed, London, Mosby Wolfe, 2006;143-155.

MAESTRELLI P, FERRAZZONI S, VISENTIN A et al. Measurement of exhaled nitric oxide in healthy adults. *Sarcoidosis vasculitis and diffuse lung diseases* 2007;24:65-69.

MAESTRELLI P, OCCARI P, TURATO G et al. Expression of interleukin (IL)-4 and IL-5

proteins in asthma induced by toluene diisocyanate (TDI). Clin Exp Allergy. 1997;27:1292-1298.

MAESTRELLI P, SCHLUNSEN V, MASON P et al. on behalf of the ERS Task Force on the Management of Work-related Asthma. Contribution of host factors and workplace exposure to the outcome of occupational asthma. Eur Respir Rev. 2012;124:88–96.

MALO J, GHEZZO H, L'ARCHEVEQUE J. Is the clinical history a satisfactory mean of diagnosing occupational asthma? Am Rev Respir Dis. 1991;143:528-532.

MANISCALCO M, GRIECO L, GALDI A. Increase in exhaled nitric oxide in shoe and leather workers at the end of the work-shift. Occup Med (Lond) 2004;54:404–407.

MANISCALCO M, SOFIA M, STANZIOLA A et al. Ruolo dell'ossido nitrico nasale nelle alte vie aeree. Europ Respir News. 2004;12:33-38.

MAPP CE, BOSCHETTO P, MAESTRELLI P et al. Occupational asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2005;172:280-305.

MASSARO AF, GASTON B, KITA D et al. Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1995;152:800-803.

MATLINE. Matrice delle esposizioni ad agenti cancerogeni, scheda del 2,4 toluene diisocianato, versione del 23/12/08, scaricabile in <http://www.Dors.it/matline/scheda.php?codsos=263>.

MENZIES D, NAIR A, LIPWORTH B. Misurazione dell'ossido nitrico esalato con apparecchi portatili; confronto con la tecnica gold standard; CHEST Ediz Ital. 2007;2:3-7.

MERGET R, SANDER I, VAN KAMPEN V, RAULF-HEIMSOTH M, HAGEMEYER O, MERRIAM-WEBSTER'S COLLEGIATE DICTIONARY 11th EDN (Merriam-Webster, inc., 2008).

MILLER MK, LEE JH, BLANC PD et al. Tenor risk score predicts healthcare in adults with severe or difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J*. 2006;28:1145–1155.

MIRANDA C, BUSACKER A, BALZAR S et al. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:101–108.

MIRANDA KM, ESPEY MG, JOURD’HEUIL D, GRISHAM MB, FUKUTO JM, FEELISH M, WINK DA. The chemical biology of nitric oxide. In: *Nitric oxide: Biology and pathobiology*, Eds: LJ Ignarro, Academic Press, San Diego, 2000, pp 41-46.

MITSUFUJI H, KOBAYASHI H, IMASAKI T, ICHIKAWA T, KAWAKAMI T, TOMITA T. Acute changes in bronchoconstriction influences exhaled nitric oxide level. *J Physiol*. 2001;51:151-157.

MOILANEN E, VUORINEN P, KANKAANRANTA H, METSÄ-KETELÄ T, VAPAATALO H. Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. *Br J Pharmacol*. 1993;109:852-858.

MOORE WC, BLEECKER ER, CURRAN-EVERETT D et al. for the National Heart, Lung, and Blood Institute’s Severe Asthma Research Program. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute’s Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:405–413.

MOORE WC, MEYERS DA, WENZEL SE et al. Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:315–323.

MOORE WC, PETERS SP. Update in asthma 2006. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:649-654.

MORRIS CR, POLJAKOVIC M, LAVRISHA L et al. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:148-153.

MOSCATO G, DALLABIANCA A, MAESTRELLI P et al. Features and severity of occupational asthma up on diagnosis: an Italian multicentric case review. *Allergy*. 2002;57:236-242.

MOSCATO G, GODNIC-CVAR J, MAESTRELLI P. Statement on self-monitoring of peak expiratory flows in the investigation of occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;96:295-301.

MUSK AW, PETERS JM, WEGMAN DH. Isocyanates and respiratory disease: current status. *Am J Ind Med*. 1988;13:331-349.

OBATA H, DITTRICK M, CHAN H, CHAN-YEUNG M. Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with western red cedar asthma. *Eur Respir J*. 1999; 13:489–495.

OLIN AC, BAKEB, TOREN K. Fraction of exhaled nitric oxide at 50 ml/s: reference values for adult life-long never smokers. *Chest*. 2007;131:1852-1856.

OLIVIERI M, TALAMINI G, CORRADI M et al. Reference values for exhaled nitric oxide (REVENO) study. *Respiratory Research*. 2006;7:94.

PAGGIARO PL, VAGAGGINI B, BACCI E et al. Prognosis of occupational asthma. *Eur Resp J*. 1994;7:761-767.

PAREDI P1, KHARITONOV SA, BARNES PJ. Faster rise of exhaled breath temperature in asthma: a novel marker of airway inflammation? *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:181-184.

PARK D, MOORE VC, BURGE CBSG et al. Serial PEF measurements is superior to cross-shift change in diagnosing occupational asthma. *Eur Respir J*. 2009;34:574–578.

PATRAWALLA P, KAZEROS A, ROGERS L et al. Application of the Asthma Phenotype Algorithm from the Severe Asthma Research Program to an Urban Population. *PLOS ONE*. 2012; 7; e44540.

PEDROSA M, BARRANCO P, LÓPEZ-CARRASCO V et al. Changes in exhaled nitric oxide levels after bronchial allergen challenge. *Lung*. 2012; 190:209-214.

PERONI DG, CHINELLATO I, PIAZZA M et al. Exhaled breath temperature and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. *Pediatric Pulmonol*. 2012;47:240-244.

PEZZINI A, RIVIERA A, PAGGIARO P et al. Specific IgE antibodies in twenty-eight workers with diisocyanate-induced bronchial asthma. *Clin Allergy*. 1984;14:453-461.

PIACENTINI GL, BODINI A, PERONI DG et al. Reduction in exhaled nitric oxide immediately after methacholine challenge in asthmatic children. *Thorax*. 2002;57:771-773.

PIACENTINI GL, PERONI D, CRESTANI E et al. Exhaled air temperature in asthma: methods and relationship with markers of disease. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:415-419.

PIACENTINI GL, PERONI DG, BODINI A ET AL. Exhaled breath temperature as a marker of airway remodelling in asthma: a preliminary study. *Allergy*. 2008;63:484-485.

PIETROPAOLI AP, PERILLO IB, TORRES A et al. Simultaneous measurement of nitric oxide production by conducting and alveolar airways of humans. *J Appl Physiol* 1999; 87(4):1532-1542.

PIIPARI R, PIIRILA P, KESKINEN H et al. Exhaled nitric oxide in specific challenge tests to assess occupational asthma. *Eur Respir J*. 2002; 20:1532–1537.

PIZZICHINI MM. et al. Prednisone-dependent asthma: inflammatory indices in induced sputum. *Eur Respir J*. 1999;13:15–21.

POULSEN R. Multivariate Statistical Analysis in SAS: Segmentation and Classification of Behavioral Data. Paper 447-2013, SAS Global Forum 2013.

RACKEMANN F. A working classification of asthma. *Am J Med.* 1947;3:601–606.

RADOMSKY MW, PALMER RM, MONCADA S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:10043-10047.

RICCIARDOLO FL, TIMMERS MC, SONT JK et al. Effect of bradykinin on allergen induced increase in exhaled nitric oxide in asthma. *Thorax.* 2003;58:840-845.

RICCIARDOLO FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, 2003, 58, 175–182.

ROY K, BORRIL ZL, HAZEL AL et al. Use of different exhaled nitric oxide multiple flow rate models in COPD. *Eur Respir J.* 2007; 29:651-659.

SAARINEN K, KARJALAINEN A, MARTIKAINEN R et al. Prevalence of work-aggravated symptoms in clinically established asthma. *Eur Resp J.* 2003; 22:305-309.

SALEH D, ERNST P, LIM S et al. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J.* 1998;12:929-937.

SARI-MINODIER I, CHARPIN D, SIGNOURET M et al. Prevalence of self-reported respiratory symptoms in workers exposed to isocyanates. *J Occup Environ Med.* 1999;41:582-588.

SASTRE J, COSTA C, DEL GARCIA POTRO M et al. Changes in exhaled nitric oxide after inhalation challenge with occupational agents. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23:421-427.

SAVA F, CARTIER A, LEMIÈRE C. Cluster Analysis of work-related asthma. Poster Board 205. Publication number: A5209. Montreal, QC/CA.

SCOTT JA, GAUVREAU GM, GRASEMANN H. Asymmetric dimethylarginine and asthma. *Eur Respir J*. 2014;43:647-648.

SCOTT JA, NORTH ML, RAFII M et al. Asymmetric dimethylarginine is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:779-785.

SELDEN AI, BELIN L, WASS U. Isocyanate exposure and hypersensitivity pneumonitis - report of a probable case and prevalence of specific immunoglobulin G antibodies among exposed individuals. *Scand J Work Environ Health*. 1989;15:234-237.

SHIN HW, CONDORELLI P, ROSE-GOTTRON CM et al. Probing the impact of axial diffusion on nitric oxide exchange dynamics with heliox. *J Appl Physiol*. 2004;97:874-882.

SHIN HW, CONDORELLI P, GEORGE SC. Examining axial diffusion of nitric oxide in the lungs using heliox and breath hold. *J Appl Physiol*. 2006;100:623-630.

SHIN HW, GEORGE SC. Impact of axial diffusion on nitric oxide exchange in the lungs. *J Appl Physiol*. 2002;93:2070-2080.

SILKOFF PE, MCCLEAN PA, CARAMORI M et al. A significant proportion of exhaled nitric oxide arises in large airways in normal subjects. *Respir Physiol*. 1998;113:33-38.

SILKOFF PE, McCLEAN PA, SLUTSKY AS et al. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155:260-267.

SILKOFF PE, SYLVESTER T, ZAMEL N et al. Airway nitric oxide diffusion in asthma. Role in pulmonary function and bronchial responsiveness. *Am J Respir Clin Care Med*. 2000; 161:1218-1228.

SIRACUSA A, KENNEDY SM, DYBUNCIO A et al. Prevalence and predictors of asthma in working groups in British Columbia. *Am J Ind Med*. 1995;28:411-423.

STAMLER JS. Redox signaling, nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 1994;78:931-936.

SUNDBLAD BM, LARSSON BM, PALMBERG L ET AL. Exhaled nitric oxide and bronchial responsiveness in healthy subjects exposed to organic dust. *Eur Respir J*. 2002;20:426–431.

SUTHERLAND ER, GOLEVA E, KING TS et al. Asthma Clinical Research Network. Cluster analysis of obesity and asthma phenotypes. *PLoS One*. 2012; 7(5):e36631.

SWIERCZYŃSKA-MACHURA D, KRAKOWIAK A, WISZNIEWSKA M, et al. Exhaled nitric oxide levels after specific inhalatory challenge test in subjects with diagnosed occupational asthma. *Int J Occup Med Environ Health*. 2008; 21:219–225.

SWIERCZYŃSKA-MACHURA D, KRAKOWIAK A, WISZNIEWSKA M et al. Diagnostic of occupational asthma: Measurements of exhaled nitric oxide. *Med. Pr*. 2005; 56:485–490.

TARLO SM, LEMIÈRE C. Occupational asthma. *N Engl J Med*. 2014;370:640-649.

TARLO SM, LISS GM. Prevention of occupational asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010;10:278-286.

TAYLOR-ROBINSON AW, LIEW FY, SEVERN A et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T-helper type 1 and T-helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 1994;24:980-984.

TEN BRINKE A, STERKP J, MASCLEA AM et al. Risk factors of frequent exacerbations in difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J*. 2005;26 812–818.

TEN BRINKE A. Risk factors associated with irreversible airflow limitation in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008;8:63-69.

TESTI R, RIZZINI P, DAL NEGRO RW et al. La salute del respiro; fattori di rischio, epidemiologia, costi e impatto sociale delle malattie respiratorie nella realtà sanitaria italiana. Fondaz. Smith Kline, EDS Antonio Angeli, 2009.

THE ENFUMOSA STUDY GROUP. The ENFUMOSA cross-sectional European multicenter study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. *Eur Respir J*. 2003;22:470–477.

THOMASSEN MJ, KAVURU MS. Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. *Int Immunopharmacol*. 2001;1:1479-1490.

TO T, STANOJEVIC S, MOORES G et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012;12: 204.

TOREN K, BLANC PD. Asthma caused by occupational exposure is common – a systematic analysis of estimates of the population-attributable fraction. *BMC PULM MED*. 2000; 9:7.

TSOUKIAS NM, GEORGE SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol*. 1998; 85(2):653-666.

TSOUKIAS NM, GEORGE SC. Impact of volume-dependent alveolar diffusing capacity on exhaled nitric oxide concentration. *Biomedical Engineering*. 2001;29:731-739.

TSOUKIAS NM, SHIN HW, WILSON AF et al. A single-breath technique with variable flow rate to characterize nitric oxide exchange dynamics in the lungs. *J. Appl Physiol*. 2001;91:477-487.

TSOUKIAS NM, TANNOUS Z, WILSON AF et al. Single-exhalation profiles of NO and CO₂ in humans: effect of dynamically changing flow rate. *J Appl Physiol*. 1998;85:642-652.

ULVESTAD B, LUND MB, BAKKE B. Gas and dust exposure in underground construction is associated with signs of airway inflammation. *Eur Respir J*. 2001;17:416–421.

VAINIO H, ROSENBERG C, HIRVONEN A et al. International workshop on biomarkers for isocyanates. *Scan J Work Environ Health*. 1999;25:157-159.

VAN MUYLEM A, NOËL C, PAIVA M. Modeling of impact of gas molecular diffusion on nitric oxide empire profile. *J Appl Physiol*. 2003;94:119-127.

VANDENPLAS O, SUOJALEHTO H, AASEN TB et al.; ERS Task Force on Specific Inhalation Challenges with Occupational Agents. Specific inhalation challenge in the diagnosis of occupational asthma: consensus statement. *Eur Respir J*. 2014;43:1573-1587.

VENABLES KM., CHAN-YEUNG M. Occupational asthma. *Lancet*. 1997;349:1465-1469.

VERBANCK S, KERCKX Y, SCHUERMANS D et al. Effect of airways constriction on exhaled nitric oxide. *J Appl Physiol*. 2008;104:925-930.

VON ESSEN SG, SCHEPPERS LA, ROBBINS RA et al. Respiratory tract inflammation in swine confinement workers studied using induced sputum and exhaled nitric oxide. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1998;36:557- 565.

WALTERS GI, MOORE VC, MCGRATH EE et al. Fractional Exhaled Nitric Oxide in the Interpretation of Specific Inhalational Challenge Tests for Occupational Asthma. *Lung*. 2014; 192:119–124.

WELLS SM, HOLIAN A. Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36:520-528.

WENZEL E.S. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature medicine*. 2012;18:716-725.

WENZEL S, WILBRAHAM D, FULLER R et al. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet*. 2007; 370:1422-1431.

WENZEL, S.E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. 2006;368:804–

WENZEL, S.E. ET AL. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156: 737–743.

WENZEL, S.E. et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:1001–1008.

WIGGS BR, BOSKEN C, PARE PD et al. A model of airway narrowing in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145:1251-1258.

XEPAPADAKI P, XATZIOANNOU A, CHATZICHARALAMBOUS M et al. Exhaled breath temperature increases during mild exacerbations in children with virus-induced asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153:70-74.

YOSHIDA M, WATSON RM, RERECICH T et al. Different profiles of T-cell IFN-gamma and IL-12 in allergen-induced early and dual responders with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:1004–1009.

ZORITCH B. Nitric oxide and asthma. *Archives of Disease in Childhood*. 1995;72:259-262.

Ringraziamenti in ordine sparso

Ai miei amati nonni, Angela e Bruno, il “termine” di questo lungo cammino di studi è anche il frutto delle loro remote fatiche, della loro fede e del loro sicuro e caldo amore nei miei confronti.

Ai miei amati genitori per la dedizione perpetua e l’amore incondizionato, aggettivi per nulla esagerati.

Ai miei fratelli, anime buone e pazienti oltre che autisti preziosi. Che la passione e l’entusiasmo per le cose nuove della vita li accompagnino sempre.

A Giuliana, con grande stima ed affetto per avermi sempre capita anche nei non-detti e supportata nelle logistiche familiari e lavorative.

Ad Elda che mi ha a lungo ascoltata ed accompagnata in tanti momenti difficili, possa tutto ciò continuare a dare frutti.

A mia figlia che non poteva non cambiarmi la vita, con l’augurio che il nostro viaggio ci porti con gioia lontano.

A mio marito, eterno sommovitore di eventi di vita, che è stato in grado di capire la mie circonlocuzioni verbali e le mie congetture esistenziali. Con amore, grazie.

Al Prof. Maestrelli, riferimento scientifico ed esempio lavorativo ed umano di grande virtù.

Ai miei primi maestri, il Prof. Vettor, il dott. Serra, il dott. Fabris, il dott. Pagano e la perfettissima dott.ssa Pilon.

Al mio spirito di soddisfazione e contentezza anche per le piccole cose. Grazie a Dio per avermelo concesso.

Ai pazienti che mi hanno fatta crescere in questi primi 10 anni di lavoro...per tutti quelli che mi “son portata a casa” sbagliando e quelli che ho imparato non doverlo fare. Sono certa di avere compiuto la scelta giusta.