



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO TERRITORIO E SISTEMI AGRO-FORESTALI

Scuola di Dottorato di Ricerca in: Territorio, Ambiente, Risorse e Salute.

Ciclo XXVIII

**“INTERAZIONE FRA DANNO POLMONARE CRONICO E INVECCHIAMENTO,  
MICROBIOMA POLMONARE ED ESPOSIZIONE AGLI INQUINANTI INALATORI.”**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. MARIO ARISTIDE LENZI

**Supervisore:** Ch.mo Prof. MARCELLO LOTTI

**Co-supervisore:** Ch.mo Prof. PIERO MAESTRELLI

**Dottoranda:** MARIA CRISTINA SCARPA



## INDICE

Summary.....	1
Riassunto.....	5
Elenco abbreviazioni.....	9
Introduzione.....	11
Parte I.....	15
Introduzione.....	15
Obbiettivo.....	17
Materiali e metodi.....	18
Risultati.....	19
a) Lavaggio nasale.....	19
b) Condensato dell'aria esalata.....	23
c) FeNO.....	26
d) Espettorato indotto.....	31
Conclusioni.....	36
Parte II.....	41
Introduzione.....	41
Obbiettivo.....	47
Materiali e metodi.....	48
Risultati.....	61
Discussione.....	85
Parte III.....	89
Introduzione.....	89
Obbiettivo.....	92
Materiali e metodi.....	93
Risultati.....	104
Discussione.....	115
Parte IV.....	121
Introduzione.....	121
Obbiettivo.....	122
Materiali e metodi.....	122
Risultati.....	124
Discussione.....	126
Conclusioni.....	129
Bibliografia.....	131



## SUMMARY

Our research project was designed to analyze the inter-play between aging, chronic lung injury, lung microbiome and exposure to air pollutants. The project was divided into four parts:

- 1) systematic review of the literature about the role of non-invasive biomarkers in detecting the acute respiratory effects of traffic-related air pollution;
- 2) retrospective/prospective study of the possible predictors of carbon particles accumulation in the airways macrophages;
- 3) prospective evaluation of the effect of smoking and/or disease (COPD) on microbial colonization of the lung;
- 4) prospective study about the effects of traffic-related air pollution and cigarette smoke on lung aging.

The first part was a systematic review of the literature on the use of samples obtained in a non-invasive way aimed to study the short-term effects of urban traffic-related air pollution on the respiratory system. Although subjects with COPD have been generally considered to be at higher risk for the adverse effects of air pollutants, these patients have been recruited only in a few studies [1-4]. According Manney et al. [1], an increase of nitrates and nitrites in exhaled breath condensate (EBC) is associated with a large exposure to particles in subjects with COPD and asthma, with no differences between the two diseases. FeNO measurements yielded conflicting results: one study found a association with PM<sub>2.5</sub> in subjects with COPD, but not with asthma [2], while in another study [3], FeNO levels resulted to be associated with PM pollution in participants with asthma but not in those with COPD. According to Gong et al. [4] cellularity of induced sputum in COPD patients is not affected by particles exposure. More research is thus required to clarify the effect of air pollution related to acute traffic in people who suffer from lung diseases other than asthma. The acute effects on respiratory disease are difficult to be attributed to a particular pollutant in most surveys with environmental exposure [5]. Further research are warranted to promote a better standardization of methods for pollutants monitoring. In real life conditions, 'unexposed' subjects do not exist and the difference between the minimum and maximum levels of air pollution is often less than three times [6]. When planning observational studies, a baseline for levels of inflammatory markers in individuals exposed to low levels of pollutants should be established to be able to detect an effect at higher exposures.

The second part of our project aimed to investigate the determinants of the accumulation of carbon particles in the cytoplasm of airway macrophages obtained from induced sputum. Three groups of subjects were enrolled: patients suffering from COPD, healthy smokers and non-smoking

healthy controls. Exposure to cigarette smoke, to indoor and outdoor air pollution, and occupational exposure was quantified with a dedicated questionnaire. This analysis aimed to control potential confounders to make a correct evaluation of the personal exposure to air pollution. The most important predictors of the black carbon (BC) load in airway macrophages resulted to be the presence of COPD and urban traffic exposure, while smoking did not show any significant association. Traffic exposure in the previous year of the visit (measured as the number of equivalent vehicles) was correlated with the carbon load. In addition, in COPD the carbon particles accumulation did not result to be correlated with the degree of obstruction nor with the degree of neutrophilic inflammation of the airways. In conclusion, quantification of BC in macrophages is suitable for assessing traffic exposure, although further studies are needed to assess macrophage function in patients with and without disease and to evaluate the biological effects of the individual carbon load.

The third part aimed to non-invasively assess the differential role of cigarette smoke and smoke-associated chronic airflow limitation on airways bacterial colonization. The molecular identification of the pulmonary microbiota in three groups of subjects was carried out. Phyla and genera present in each subject and in each group were identified. It was then calculated  $\alpha$  and  $\beta$  diversity index to evaluate the differences in bacterial composition intra sample and between samples of the same group, respectively. The composition of phyla in stable COPD patients was similar to that found in earlier research based on the use of bronchial brushing and bronchoalveolar lavage with the advantage that our number of sequence reading was much higher than those previously analyzed. It was also observed that subjects with COPD who received corticosteroids showed a lower abundance of bacteria of genus *Prevotella* and greater abundance of *Veillonella* genus compared to untreated subjects. Smokers have an increased relative number of *Neisseria* and *Bergeyella* genera, and a decreased relative number of *Streptococcus* and *Rothia* genera compared to non-smokers. Our results suggested that cigarette smoking may cause a decrease in the relative abundance of species, regardless of the development of chronic airflow limitation, thus influencing the composition of the lung microbiome. Molecular analysis proved to be indispensable to compare different niches and to identify the most abundant organisms present in different groups. Indeed, traditional culture tests and biochemical assays did not allow phenotypic identification of bacteria. The analysis of the resident microbiota in patients with stable COPD compared to smokers and non-smokers suggested the richness of the microbiota is important for lung health.

In the fourth part of the research a feasibility study of DNA extraction from sputum cells and the respective quantification was performed. The evaluation of lung aging due to urban pollution and cigarette smoke was carried out on both samples of blood and induced sputum and the

telomere length will be measured. We expected that the rate of decline in lung function would be associated with the rate of biological aging. We also assumed that aging in white blood cells reflects that of cells coming from induced sputum. We expected that cigarette smoking accelerates the aging of cells in induced sputum when inflammation and exposure to environmental pollution are constant.

In conclusion, the presence of COPD affects both the lung carbon load linked to urban traffic (with the same external exposure of the subjects), and the biodiversity of lung microbial colonization. On the other hand, cigarette smoking has no effect on the content of carbon particles, but acts on the composition of the microbiota.



## RIASSUNTO

Il progetto di ricerca nel suo insieme si proponeva di analizzare l'interazione tra danno polmonare cronico, invecchiamento, microbioma polmonare ed esposizione agli inquinanti inalatori. Il progetto era articolato in quattro parti:

- 1) revisione sistematica della letteratura sul ruolo dei biomarcatori non invasivi nello studio degli effetti respiratori acuti dell'inquinamento associato a traffico;
- 2) studio retrospettivo/prospettico dei determinanti dell'accumulo delle particelle carboniose nei macrofagi delle vie aeree;
- 3) valutazione prospettica dell'effetto del fumo e/o della malattia (BPCO) sulla colonizzazione microbica a livello polmonare;
- 4) studio prospettico dell'effetto dell'inquinamento urbano e del fumo di sigaretta sull'invecchiamento polmonare.

La prima parte era un'analisi sistematica della letteratura sull'uso di campioni ottenuti in modo non invasivo per studiare degli effetti a breve termine sul sistema respiratorio dell'inquinamento atmosferico dovuto a traffico urbano. Da questa emerge che, sebbene i soggetti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) siano stati generalmente considerati a più alto rischio per gli effetti negativi degli inquinanti atmosferici, questi pazienti sono stati reclutati solo in pochi studi [1-4]. Secondo Manney et al. [1], l'aumento di nitrati e nitriti nel condensato dell'aria esalata (EBC) è stato associato con una grossa esposizione di particelle nei soggetti con BPCO e asmatici, senza differenze significative tra le due malattie. Le misure di ossido nitrico esalato (FeNO) in altri due studi hanno dato risultati opposti: uno ha trovato un rapporto con PM<sub>2.5</sub> in soggetti con BPCO, ma non con asmatici [2], mentre nell'altro [3], il FeNO è stato associato con livelli di inquinamento da PM nei partecipanti con asma ma non in quelli con BPCO. Secondo Gong et al. [4] la cellularità dell'espettorato indotto in soggetti con BPCO non è influenzata dall'esposizione a particolato. Sono quindi necessarie nuove ricerche volte a chiarire l'effetto dell'inquinamento atmosferico acuto legato al traffico in soggetti che soffrono di malattie polmonari diverse dall'asma. Tuttavia, gli effetti acuti sulla salute sono difficili da attribuire ad un particolare inquinante nella maggior parte delle indagini con esposizione ambientale [5]. Ulteriori ricerche dovrebbero essere dirette a promuovere una migliore standardizzazione dei metodi per monitorare gli inquinanti da traffico. Va ricordato che, in condizioni di vita reale, i soggetti veramente 'non esposti' non esistono e la differenza tra i livelli minimi e massimi di inquinamento atmosferico è spesso meno di tre volte [6]. Dovrebbe essere stabilita, in particolare quando si pianificano studi

osservazionali, una base di riferimento per i livelli di marcatori infiammatori in soggetti esposti a bassi livelli di sostanze inquinanti per essere in grado rilevare un effetto con esposizioni più elevate.

Nella seconda parte l'obiettivo era di indagare i determinanti dell'accumulo di particelle carboniose nel citoplasma dei macrofagi delle vie aeree ottenuti dall'espettorato indotto. A tale scopo si sono arruolati tre gruppi di soggetti: affetti da BPCO, fumatori sani e controlli non fumatori sani. Tramite questionario è stata valutata la loro esposizione a fumo passivo di sigaretta, a inquinamento *indoor*, a inquinamento dell'aria negli spostamenti quotidiani e all'esposizione professionale. Questa analisi ha permesso di controllare i potenziali fattori confondenti per poter eseguire una corretta analisi dell'esposizione personale a inquinamento dell'aria. Si è osservato come i maggiori determinanti del contenuto di *black carbon* (BC) nei macrofagi delle vie aeree siano la presenza di BPCO e l'esposizione al traffico urbano, mentre non è stato dimostrato un ruolo dell'abitudine al fumo di sigaretta. L'esposizione a traffico (misurato come numero di veicoli equivalenti) era correlata con il carico di particelle carboniose. Inoltre, per quanto concerne la BPCO, l'accumulo di particelle carboniose non risulta correlato con il grado di ostruzione né con il grado di infiammazione neutrofila delle vie aeree. La quantificazione di BC nei macrofagi risulta adatta a valutare l'esposizione a traffico, anche se sono necessari ulteriori studi sulla funzionalità dei macrofagi nei soggetti con e senza malattia e una valutazione degli effetti biologici sul singolo individuo dovuti all'accumulo di BC.

Nella terza parte si è proposto di valutare, in modo non invasivo, il ruolo differenziale del fumo di sigaretta e della limitazione cronica del flusso aereo associata a fumo sulla colonizzazione batterica delle vie aeree. È stata quindi effettuata l'identificazione molecolare del microbiota polmonare residente nei 3 gruppi di soggetti. Sono stati identificati i phyla e i generi presenti in ciascun soggetto e in ogni gruppo. Sono stati poi calcolati gli indici di diversità  $\alpha$  e  $\beta$  per valutare rispettivamente le differenze di composizione batterica intra campione e tra campioni dello stesso gruppo. La composizione in phyla nei pazienti BPCO stabili è risultata essere simile a quella trovata nelle precedenti ricerche basate sull'utilizzo di *brushing* bronchiale e broncolavaggio, con il vantaggio che il nostro numero di letture di sequenza è molto più alto di quelli precedentemente analizzati. Inoltre si è osservato che i soggetti con BPCO che ricevevano corticosteroidi mostravano una scarsa abbondanza di batteri di genere *Prevotella* e un'abbondanza maggiore di batteri di genere *Veillonella* rispetto ai soggetti non trattati. I fumatori rispetto ai non fumatori hanno un numero relativo aumentato dei generi *Neisseria* e *Bergeyella*, mentre è diminuito per i generi *Streptococcus* e *Rothia*. I risultati suggeriscono che il fumo di sigaretta possa indurre una diminuzione dell'abbondanza relativa di specie, indipendentemente dallo sviluppo della limitazione cronica al flusso aereo, influenzando così la composizione del microbioma polmonare. L'analisi

molecolare si è rivelata indispensabile per confrontare nicchie diverse e identificare organismi più abbondanti presenti in un gruppo rispetto ad un altro, cosa che l'identificazione fenotipica dei batteri, ottenuta tramite i tradizionali esami colturali e saggi biochimici non consentiva. L'analisi del microbiota residente nei pazienti con BPCO stabile rispetto ai fumatori e soggetti non fumatori suggerisce che la ricchezza del microbiota è importante per la salute polmonare.

Per svolgere l'ultima parte della ricerca è stato fatto uno studio di fattibilità dell'estrazione del DNA da cellule dell'espettorato e relativa quantificazione. La valutazione dell'invecchiamento polmonare dovuto ad inquinamento urbano e a fumo di sigaretta sarà effettuata sia su campioni di sangue che di espettorato misurando la lunghezza dei telomeri.

Ci si aspetta che il tasso di declino della funzione polmonare sia associato al tasso di invecchiamento biologico. Tra risultati attesi ipotizziamo anche che l'invecchiamento nei leucociti del sangue rispecchi quello delle cellule dell'espettorato indotto. A parità di infiammazione e di esposizione all'inquinamento ambientale, ci si aspetta che il fumo di sigaretta acceleri l'invecchiamento delle cellule dell'espettorato indotto.

In conclusione, la presenza di BPCO influenza sia il carico di particelle carboniose nel polmone legate al traffico urbano (a parità di esposizione esterna dei soggetti), sia la biodiversità della colonizzazione microbica polmonare. Viceversa, il fumo di sigaretta non ha effetti sul contenuto di particelle carboniose, ma agisce sulla composizione del microbiota.



## ELENCO ABBREVIAZIONI

ATP: adenosina tri-fosfato	PPM: microrganismi patogeni
BAL: bronco-lavaggio	ROS: specie reattive dell'ossigeno
BC: black-carbon	TU: traffico urbano
BMI: indice di massa corporea	UFP: particelle ultra fini
BPCO: bronco-pneumopatia cronico ostruttiva	VC: capacità vitale
BU: background urbano	VES: velocità di eritro-sedimentazione
Cpm: conte per milioni	VOC: composti organici volatili
DE: diesel exhaust	
DEP: particelle di scarico diesel	
DTT: ditiotritolo	
EBC: esalato dell'aria condensata	
F: fumatori	
FeNO: ossido nitrico esalato	
FEV1: volume espiratorio forzato in 1 secondo	
FVC: capacità vitale forzata	
GIS: sistema informatico di geo- localizzazione	
IPA: idrocarburi policiclici aromatici	
IS: espettorato indotto	
KCO: costante di diffusione della CO	
NAL: lavaggio nasale	
NF: non fumatori	
NGS: sequenziamento di nuova generazione	
OMS: organizzazione mondiale della sanità	
OTU: unità tassonomiche operative	
PBS: tampone fosfato	
PM: particolato	



## INTRODUZIONE

Nell'aria vengono rilasciate continuamente milioni di tonnellate di particelle nocive e gas. I veicoli a motore sono una delle principali fonti di inquinamento atmosferico, seguiti dalle centrali elettriche, dalle fabbriche, dagli uffici e dalle abitazioni [7]. Gli esseri umani entrano in contatto con le diverse sostanze inquinanti principalmente attraverso l'inalazione e l'ingestione, mentre il contatto dermico rappresenta soltanto una via minore di esposizione [8]. Le persone che hanno già una malattia polmonare, gli anziani e i bambini hanno maggiori probabilità di essere colpiti dall'aumento improvviso degli inquinanti atmosferici. Recenti ricerche suggeriscono che l'inquinamento atmosferico contribuisca al grande carico globale di malattie respiratorie e allergiche, tra cui la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), l'asma, la polmonite e, eventualmente, la tubercolosi [9]. Come dimostrato in diversi studi epidemiologici, degli incrementi di particelle sospese nell'aria sono associati ad una più alta mortalità e morbilità per malattie cardiopolmonari, tra cui BPCO, asma, aritmie, insufficienza cardiaca congestizia e infarto del miocardio [10]. Tuttavia tra tutte le malattie polmonari si ritiene che la BPCO abbia l'associazione più forte con l'esposizione all'inquinamento atmosferico e in particolare con il PM [8].

La BPCO secondo le più recenti linee guida è definita come “una frequente malattia prevenibile e trattabile, caratterizzata da una persistente limitazione al flusso aereo, che è solitamente evolutiva e associata ad una aumentata risposta infiammatoria cronica delle vie aeree e del polmone a particelle nocive o gas” [9]. La BPCO è caratterizzata da ipersecrezione di muco, fibrosi delle piccole vie aeree e distruzione dello spazio alveolare (enfisema). La BPCO ha un notevole impatto socio-economico, infatti è l'unica patologia cronica la cui prevalenza è in continuo aumento, tanto che attualmente costituisce la quarta causa di morte nei paesi industrializzati e si stima che possa diventare la terza causa di morte prima del 2020 [10]. Fino ad ora nessuna terapia si è dimostrata efficace nel combattere la progressione di questa patologia che una volta instaurata, può diventare invalidante e richiedere interventi importanti quali l'ospedalizzazione. Nelle nazioni sviluppate, la principale causa di BPCO è l'esposizione al fumo di tabacco, prevalentemente diretto, mentre nelle nazioni in via di sviluppo l'inquinamento indoor da combustione di combustibile da biomassa contribuisce in modo significativo [9].

Il fumo di sigaretta è riconosciuto essere responsabile per la maggioranza dei casi di BPCO e l'infiammazione delle vie aeree è presente in quasi tutti i fumatori, eppure solo il 15-25% dei fumatori sviluppa clinicamente la BPCO [10]. Tale discrepanza mette in evidenza il probabile ruolo dei fattori genetici e di suscettibilità, e la loro interazione con diversi profili di esposizione a inquinamento. Tuttavia alcuni autori sostengono che l'aumentata suscettibilità dei pazienti con

BPCO agli effetti nocivi del PM ambientale possa essere dovuta alle correlazioni (o interazioni) tra PM e altri componenti tossici dell'inquinamento, o ad un insieme di molti fattori di rischio indipendenti (come l'età, il diabete, le malattie cardiache), di differenze tra le diverse attività svolte dai singoli individui BPCO (come la stima del tempo speso in ambienti chiusi) e di un aumentato tasso di deposizione di particelle [11, 12].

Dalla descrizione iniziale della BPCO come una condizione clinica distinta responsabile di tosse produttiva e dispnea nei pazienti senza tubercolosi, c'è stata una notevole polemica sul ruolo dei batteri del tratto respiratorio inferiore nella sua patogenesi. Questo sia per la sua prolungata fase precoce asintomatica e sia, fino a poco tempo fa, per le riacutizzazioni che punteggiano le sue fasi successive, che possono indurre un'accelerata e sostenuta perdita della funzione polmonare [13]. In parte, questa polemica sorse a causa di studi basati su esami colturali che suggerivano che i polmoni di individui sani fossero sterili [14, 15], mentre si credeva che i polmoni dei pazienti con BPCO fossero colonizzati. Più recentemente, le tecniche microbiologiche indipendenti dalle culture batteriche hanno dimostrato che i polmoni nelle persone in salute non sono sterili e hanno documentato variazioni del microbioma polmonare in soggetti affetti da asma e fibrosi cistica [16]. Con studi di sequenziamento dell'rRNA 16S si è visto che regioni distinte del tratto respiratorio superiore contengono delle comunità microbiche caratteristiche che risultano essere alterate in soggetti fumatori rispetto ai non fumatori e possono contribuire alla prevalenza delle complicazioni del tratto respiratorio [17]. Tuttavia il ruolo del microbiota del polmone rimane ancora poco chiaro nella patogenesi e nella progressione della BPCO.

L'esposizione a sostanze inquinanti del traffico è stato collegato all'attivazione di processi biologici, come la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e all'attivazione di vie infiammatorie, che possono accelerare l'accorciamento dei telomeri. L'accorciamento dei telomeri nei leucociti del sangue è stato dimostrato essere accelerato da fattori ambientali che aumentano l'invecchiamento biologico, tra cui il fumo. Gli studi pubblicati finora sono stati eseguiti secondo un disegno *cross-sectional*, la stima dell'esposizione cumulativa personale a PM era basata su misurazioni esterne e la lunghezza dei telomeri era stata analizzata solo nei leucociti del sangue periferico, ma non in cellule dell'organo bersaglio, come il polmone.

Le attività di ricerca nel loro insieme si propongono di analizzare l'interazione tra danno polmonare cronico, invecchiamento, microbioma polmonare ed esposizione agli inquinanti inalatori e si articolano in quattro parti:

- 1) ruolo dei biomarcatori non invasivi nello studio degli effetti respiratori acuti dell'inquinamento associato a traffico.

- 2) Determinanti dell'accumulo delle particelle carboniose nei macrofagi delle vie aeree.
- 3) Effetto del fumo e/o della malattia (BPCO) sulla colonizzazione microbica a livello polmonare.
- 4) Invecchiamento polmonare dovuto ad inquinamento urbano e a fumo di sigaretta.



## **PARTE I**

### **Ruolo dei biomarcatori non invasivi nello studio degli effetti respiratori acuti dell'inquinamento associato a traffico**

#### **INTRODUZIONE**

Nell'aria vengono rilasciati milioni di tonnellate di particelle e gas nocivi. I veicoli a motore sono una fonte importante di inquinamento atmosferico seguita da centrali elettriche, fabbriche, uffici e abitazioni [18]. Le persone che hanno già una malattia polmonare, gli anziani e i bambini hanno maggiori probabilità di essere colpiti dall'aumento a breve termine di inquinanti atmosferici. L'incidenza delle malattie respiratorie allergiche e l'asma bronchiale sembrano essere in aumento in tutto il mondo, e la gente che vive nelle aree urbane sperimenta più frequentemente queste condizioni di quella che vive in zone rurali. Una delle cause di aumento della morbilità associata a malattie respiratorie allergiche è l'aumentata presenza di inquinanti dell'aria esterna [7, 19]. Recenti ricerche suggeriscono che l'inquinamento atmosferico contribuisce al grande carico globale di malattie respiratorie e allergiche, tra cui la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), l'asma, la polmonite e la tubercolosi [20]. Come mostrato in diversi studi epidemiologici, gli incrementi di particolato nell'aria sono associati a una maggiore mortalità e morbilità per malattie cardiopolmonari, tra cui la BPCO, l'asma, aritmie, insufficienza cardiaca congestizia ed infarto [21]. Nei paesi sviluppati, i principali inquinanti emessi nell'atmosfera e attualmente misurati includono il particolato (PM), gli inquinanti gassosi (CO, SO<sub>2</sub>, ossidi di azoto, (O<sub>3</sub>), i composti organici volatili (VOC) e l'ammoniaca (NH<sub>3</sub>). Il PM è una miscela di solidi sospesi e particelle liquide di varie dimensioni e composizioni. Il PM viene classificato secondo il suo diametro aerodinamico in PM<sub>10</sub> (diametro <10 µm), PM<sub>2.5</sub> (polveri sottili con diametro <2,5 µm) e PM<sub>0,1</sub> (particelle ultrafini con diametro <0,1 µm). Quest'ultimo è considerato come potenzialmente il più pericoloso e rappresenta un importante componente di scarico di veicoli a motore. I gas idrosolubili (come l'SO<sub>2</sub>) reagiscono con lo strato di muco delle vie aeree superiori, mentre i gas meno solubili (come l'NO<sub>2</sub>) hanno maggiori probabilità di raggiungere gli alveoli. L'O<sub>3</sub> è un forte ossidante sintetizzato, in assenza di ventilazione, per reazione fotochimica dovuta alla combinazione della radiazione solare ultravioletta con i gas di scarico, come l'NO<sub>2</sub> e gli idrocarburi. Una volta emessi, gli inquinanti interagiscono tra loro e con l'ambiente in modi complessi, che possono dipendere dalla temperatura, dall'umidità e da altre condizioni ambientali. Così, le concentrazioni di inquinamento, la loro composizione e, eventualmente, la tossicità sono variabili a seconda di questi fattori [19]. Gli esseri

umani entrano in contatto con diversi inquinanti dell'aria soprattutto per inalazione e ingestione, mentre il contatto cutaneo rappresenta solo una via secondaria di esposizione.

Durante le comuni attività umane gli individui sono sottoposti all'inquinamento atmosferico prodotto dal traffico con un'alta intensità e una breve esposizione. Se altri fattori variabili, quali le condizioni climatiche e del giorno della settimana, vengono adeguatamente controllati nelle analisi, gli studi a breve termine sono estremamente potenti e rappresentano efficaci strumenti per esplorare gli effetti acuti dell'inquinamento atmosferico. Infatti, le caratteristiche individuali (abitudine al fumo, le malattie, i fattori genetici, ecc.) non cambiano da un giorno all'altro e non agiscono come fattore confondente delle associazioni tra inquinamento dell'aria e gli effetti acuti. Inoltre, in studi a breve termine i soggetti spesso servono come loro controllo [6].

L'evidenza che l'inquinamento atmosferico abbia effetti negativi sulla salute si basa su una vasta gamma di metodi di ricerca. Gli approcci sperimentali e ambientali forniscono i due strumenti più importanti per studiare questa tematica. Gli studi sperimentali consistono in esposizioni controllate in una camera o laboratorio, con l'inalazione di un singolo inquinante o una miscela ben definita (es. scarico diesel (DE)), ed è possibile costruire una curva dose-risposta a seconda dei diversi livelli di inquinanti e della durata dell'esposizione. I tipici partecipanti a studi con esposizione controllata sono adulti sani o persone con malattie lievi, così i risultati sperimentali non possono essere generalizzati ai gruppi potenzialmente più a rischio come i bambini, le persone anziane o gli individui con malattie più gravi. Negli studi ambientali invece l'esposizione è sempre ad una miscela di sostanze inquinanti e né la composizione né il livello possono essere modificati dallo sperimentatore. Il ruolo di singoli inquinanti è difficile da interpretare, ma è possibile osservare soggetti per periodi di esposizione più lunghi. Un approccio ambientale permette di identificare sottogruppi con maggiore o minore sensibilità agli effetti negativi dell'inquinamento atmosferico. In entrambi i casi la valutazione quantitativa dell'esposizione poi può essere realizzata mediante campionamento ambientale e/o personale.

Per la valutazione dell'infiammazione delle vie aeree nella BPCO, nell'asma e nelle malattie respiratorie e occupazionali sono sempre più utilizzati dei metodi non invasivi. Tuttavia non è chiaro il loro ruolo nello studio degli effetti a breve termine dell'inquinamento da traffico sul sistema respiratorio.

## **OBBIETTIVI**

È stata effettuata una ricerca bibliografica sull'uso di metodi non invasivi nello studio degli effetti a breve termine sul sistema respiratorio dell'inquinamento atmosferico dovuto a traffico. In particolare si voleva rispondere alle seguenti questioni:

- ci sono biomarcatori più utili di altri per rilevare gli effetti acuti di inquinamento legati al traffico a seconda dell'età dei soggetti (bambini o adulti)?
- gli effetti rilevati da biomarcatori dipendono dallo stato di salute o malattia dei soggetti?
- ci sono cambiamenti nei livelli di biomarcatori influenzati da una specifica esposizione ad un inquinante?
- ci sono biomarcatori più sensibili dei parametri di funzionalità polmonare per individuare gli effetti dell'inquinamento da traffico nelle vie respiratorie?

## **MATERIALI E METODI**

Per ogni studio quindi sono stati messi in evidenza i biomarcatori analizzati, il tipo di esposizione e gli inquinanti a cui erano sottoposti i soggetti e infine la popolazione reclutata. La ricerca finale della letteratura con Pub-Med è stata condotta nel mese di dicembre del 2013, escludendo i documenti pubblicati prima del 1999. Ulteriori documenti sono stati recuperati dai riferimenti incrociati. L'abstract di ogni titolo è stato valutato in modo indipendente da due autori per coerenza con gli obiettivi di ricerca (PM, MCS). Sono stati selezionati studi sull'uomo per quanto riguarda l'esposizione all'inquinamento atmosferico a breve termine (definito come un'esposizione fino a 7 giorni) per la valutazione. Sono stati inclusi solo lavori sui biomarcatori ottenuti con metodi di campionamento non invasivi. La presente revisione è focalizzata sull'inalazione di inquinanti relativi al traffico; quindi, gli studi sull'esposizione professionale alla polvere o sull'esposizione al fumo di tabacco, incluso il fumo passivo, o per quanto riguarda l'esposizione a pollini non sono stati considerati in questo contesto, così come sono stati esclusi studi relativi al rischio di cancro. I risultati della ricerca, tra cui il tipo di studi, inquinanti, di biomarker e analisi della popolazione e dei loro principali risultati sono stati riportati in tabelle. L'eterogeneità degli studi ha impedito l'uso di metodi analitici sofisticati. La formulazione delle dichiarazioni è stata classificata in base al sistema a tre stelle del Royal College of General Practitioners (RCGP) [22].

## RISULTATI

### *Risultati della ricerca di letteratura*

I termini di ricerca portano a 535 titoli di articoli, tra i quali 128 avevano *abstract* potenzialmente rilevanti. Cinquantanove articoli sono stati esclusi in quanto non pertinenti alle finalità della *review* (35 riguardavano un'esposizione cronica, quattro un'esposizione professionale, sei un'esposizione *indoor*, cinque fumo di tabacco, cinque studi erano *in vitro* e quattro studi erano effettuati su animali). Alla fine, sono stati considerati 69 lavori e sono stati inclusi come riferimenti finali.

#### *a) Lavaggio nasale*

Il lavaggio nasale (NAL) consiste nell'instillazione di soluzione fisiologica nella cavità nasale e il suo recupero dopo un predeterminato tempo. È stato utilizzato per studiare eventi nella mucosa e intraluminari nella rinite [23], e i marcatori dell'epitelio nasale sono oggetto di crescente interesse per valutare i danni alle vie aeree causati dall'inquinamento atmosferico. Il naso costituisce una superficie mucosa facilmente accessibile per il campionamento [24]. Possono essere effettuati lavaggi ripetuti, consentendo ad ogni soggetto di servire come proprio controllo e permettendo la valutazione dell'andamento nel tempo di una risposta. Tuttavia nell'interpretazione dei risultati, il deve essere considerato tasso di diluizione e con il campionamento ripetuto c'è il rischio di perdita di materiale.

Sono stati identificati nove studi sugli effetti a breve termine dell'inquinamento atmosferico che impiegavano biomarcatori nasali [25-33] (Tabella 1). Utilizzando un'esposizione sperimentale di 0,2 ppm di O<sub>3</sub> per 4 h, Nightingale et al. [25] hanno misurato l'NO nasale in volontari sani e asmatici atopici per valutare gli effetti acuti dell'O<sub>3</sub>. Analogamente, Olin et al. [26] hanno esaminato soggetti sani esposti a O<sub>3</sub>, ma per 2 h. Entrambi gli studi hanno concluso che l'NO nasale non è un marcatore utile per rilevare gli effetti indotti da ozono. D'altra parte, utilizzando le stesse condizioni sperimentali, Nightingale et al. [25] e Mudway et al. [31] suggeriscono che l'acido urico nel fluido di rivestimento del tratto respiratorio nasale potrebbe conferire protezione all'esposizione a ozono. Gomes et al. [32] hanno studiato anche l'impatto del calore e dell'umidità sull'esposizione a ozono. Dei segni indiretti di danno epiteliale e un meccanismo protettivo contro lo stress ossidativo sono stati osservati solo quando l'esposizione all'ozono è stata associata con esercizio ad alta intensità, calore e umidità.

Gli effetti dei diversi inquinanti sulle cellule e sulle citochine del NAL sono stati considerati negli studi con esposizione ambientale a diversi lassi di tempo. La popolazione più studiata è rappresentata dai bambini [27-29]. Steerenberg et al. [27] hanno osservato un aumento dei

marcatori nasali di infiammazione misurati nei bambini delle aree urbane, rispetto a quelli misurati nei bambini residenti in periferia. IL-8 è un mediatore infiammatorio analizzato in quattro documenti [27, 28, 30, 33], e in tre di essi [27, 28, 33], era positivamente associato con l'inquinamento atmosferico da traffico. Larsson et al. [15] hanno dimostrato che IL-10, IL-12 e TNF $\alpha$  aumentano, ma i livelli di IL-8 e cellularità nel NAL non cambiano dopo inalazione di alte concentrazioni di inquinanti atmosferici. Il basso numero di soggetti (n = 5) limita la forza della loro scoperta. Inoltre, rispetto alla maggior parte degli altri lavori [27-29], Larsson et al. [30] hanno trovato la funzione polmonare inalterata dopo l'esposizione. Secondo Barraza- Villarreal et al. [28] i bambini non asmatici e asmatici hanno una diversa sensibilità all'inquinamento da traffico: nei non-asmatici un aumento dei livelli di IL-8 è stato associato con l'esposizione a PM e NO<sub>2</sub>, mentre negli asmatici è stato associato all'esposizione a O<sub>3</sub>. Lo studio di Renzetti et al. [29] si focalizza in particolare sulla conta degli eosinofili nasali ed ha dimostrato che si tratta di un biomarcatore sensibile per monitorare l'infiammazione delle vie aeree indotta da inquinamento nei bambini allergici, riducendosi a livelli normali solo 1 settimana dopo alla ricollocazione di questi da un ambiente urbano più inquinato a un ambiente rurale meno inquinato.

In sintesi, la letteratura sinora pubblicata dimostra che i cambiamenti dei mediatori infiammatori nel NAL sono influenzati dall'esposizione a traffico e confermano il peggioramento respiratorio rilevato dai parametri di funzionalità polmonare. I risultati derivano principalmente dalle indagini nei bambini poichè solo uno studio con esposizione ambientale ha reclutato adulti con asma [30]. L'associazione tra gli inquinanti e i livelli di biomarcatori nel NAL è stata osservata ad intervalli di tempo che variavano da 7 h a 7 giorni. Il confronto diretto dell'andamento nel tempo delle variazioni è impedito da una scelta non omogenea dei tempi tra i vari studi e da un comportamento diverso di ciascun inquinante. Ulteriori studi su biomarcatori nasali sarebbero necessari negli adulti e nei soggetti sani.

Author, year	Biomarker	Exposure type	Pollutant(s)	Population (age)	Major findings	Lag
Nightingale, 1999 [10]	Nasal NO	Experimental	O <sub>3</sub> 0.2 ppm for 4 h	10 healthy volunteers and 10 atopic asthmatics (18–39 years)	No nasal NO changes	
Mudway, 1999 [16]	Cell count MDA GSH Ascorbic acid UA $\alpha$ -tocopherol Extracellular-SOD Total protein Albumin MPO	Experimental	O <sub>3</sub> 0.2 ppm for 2 h	13 healthy volunteers (20–31 years)	Depletion of nasal respiratory tract lining fluid UA	
Olin, 2001 [11]	Nasal NO	Experimental	O <sub>3</sub> 0.2 ppm for 2 h	11 healthy non-smokers (20–29 year)	No nasal NO changes	
Gomes, 2011 [17]	IL-6 IL-8 CC16 Albumin UA GSH Total protein Total antioxidant	Experimental	O <sub>3</sub> 0.1 ppm at 20°C and 50% rh; O <sub>3</sub> 0.1 ppm at 31°C and 70% rh.	10 male runners (18–30 years)	Increase in CC16 and GSH/protein in the heat and O <sub>3</sub> trial	
Steenberg, 2001 [12]	Cell count IL-8 Albumin UA Urea Nitrate, nitrite	Environmental	PM <sub>10</sub> NO NO <sub>2</sub> CO SO <sub>2</sub> BS	126 children (8–13 years of age)	Increase in all inflammatory nasal markers analysed	1, 3 and 6 days
Barraza-Villarreal, 2008 [13]	IL-6 IL-8 IL-10	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	158 asthmatic and 50 non-asthmatic schoolchildren (7–11 years)	Increased IL-8 associated with PM and NO <sub>2</sub> in non-asthmatic, associated with O <sub>3</sub> in asthmatics	0, 4 and 5 days
Romieu, 2008 [18]	IL-8	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	107 asthmatic children (mean age 9.5 years)	Augmented NAL IL8 levels related to MDA increase in EBC	0, 1 and 2 days

**Tabella 1.** Sommario degli studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano biomarcatori del lavaggio nasale. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.

Author, year	Biomarker	Exposure type	Pollutant(s)	Population (age)	Major findings	Lag
Renzetti, 2009 [14]	Nasal eosinophils	Environmental	PM <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> CO	37 untreated allergic children (7 years of age or older) with mild persistent asthma	Decreased nasal eosinophils after 1 week relocation from urban to rural environmental	7 days
Larsson, 2010 [15]	Cell count IL-1 IL-2 IL-4 IL-5 IL-6 IL-8 IL-10 IL-12 IFN $\gamma$ TNF $\alpha$	Environmental	benzene PM <sub>2.5</sub> 183 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ PM <sub>10</sub> 80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ NO 711 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ NO <sub>2</sub> 265 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ CO 3.2 mg/m <sup>3</sup> for 2 h	14 mild asthmatic and the majority with allergy (24–38 years)	Increased IL-10, IL-12 and TNF $\alpha$ . Correlation between PM <sub>2.5</sub> exposure and increase in IL-10 concentration.	7 h

BS, black smoke; EBC, exhaled breath condensate; TSP, total suspended particles; MDA, malondialdehyde; GSH, reduced glutathione; UA, uric acid; SOD, superoxide dismutase; MPO, myeloperoxidase; rh, relative humidity.

**Tabella 1 (continuazione).** Sommario degli studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano biomarcatori del lavaggio nasale. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.

*b) Condensato dell'aria esalata.*

L'EBC è un fluido biologico che si ottiene mediante il raffreddamento dell'aria espirata durante 15 minuti di il respiro tranquillo. La raccolta dell'EBC è un metodo per campionare il liquido di rivestimento delle vie aeree e può essere eseguito più volte senza danneggiare il paziente, perciò è fattibile in studi che coinvolgono un gran numero di pazienti. Dati pubblicati recentemente hanno dimostrato che metalli, oligoelementi e sostanze chimiche specifiche possono essere rilevati nell'EBC di soggetti professionalmente esposti [31-35]. L'EBC ha il potenziale per essere utilizzato per valutare la dose di inquinanti ambientali inalati dall'organo bersaglio.

Sono stati condotti tre studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano biomarcatori dell'EBC e impiegano una camera di esposizione (Tabella 2). Nightingale et al. [25] hanno misurato i nitriti nell'EBC di volontari sani ed asmatici atopici per valutare gli effetti acuti dell'O<sub>3</sub>, ma non hanno osservato cambiamenti significativi nei livelli di nitriti. Nel lavoro di Hubbard et al. [36], 11 non fumatori sani sono stati esposti a DE e nell'EBC, nonostante l'applicazione di un accurato metodo di analisi, non sono stati rilevati livelli significativamente elevati di composti organici volatili polari. Hussain et al. [37] hanno esposto 16 adulti asmatici a 300 g/m<sup>3</sup> PM2.5 per 1 ora e hanno osservato un aumento di nitriti nell'EBC, ma senza variazioni di pH.

Nonostante la valutazione del pH sia una delle misure più semplici e standardizzate che possano essere eseguite sull'EBC, ha dato risultati controversi. In studi di esposizione ambientale, Mc Creanor et al. [38], Barraza-Villareal et al. [28], Zhang et al. [39] e Martins et al. [40] hanno dimostrato una diminuzione del pH nei soggetti asmatici; viceversa Epton et al. [43], Folino et al. [42] e Maestrelli et al. [43], rispettivamente in bambini con dispnea, in pazienti con infarto miocardico e in adulti asmatici, non hanno trovato cambiamenti significativi di pH legati all'inquinamento atmosferico.

Secondo Liu et al. [45] la misura dei livelli di sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) può essere utile per indagare lo stress ossidativo dovuto ad inquinamento urbano: bambini asmatici esposti a PM2.5, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> ne mostrano un significativo aumento.

Un aumento di nitrati e nitriti è stato osservato associato a livelli di particelle grossolane sia in pazienti asmatici e che nei BPCO [46]. Questo studio ha misurato l'esposizione a PM10 e PM2.5 e ha concluso che le particelle grossolane hanno effetti sulla salute di cui le politiche di inquinamento atmosferico dovrebbero tener conto. Come affermato dagli autori, i composti di azoto nell'EBC possono riflettere un effetto di esposizione a PM prima che tali effetti diventino abbastanza marcati da modificare i parametri di funzionalità respiratoria.

Author, year	Biomarker	Exposure type	Pollutant(s)	Population (age)	Major findings	Lag
Nightingale, 1999 [10]	Nitrite	Experimental	O <sub>3</sub> 0.2 ppm for 4 h	10 healthy volunteers and 10 atopic asthmatics (18–39 years)	No changes in nitrite levels	
Corradi, 2002 [19]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> MDA 8-isoprostane LTB <sub>4</sub> pH	Experimental	O <sub>3</sub> 0.1 ppm for 2 h	22 healthy non-smokers (27–33 years)	Sudden increase in 8-isoprostane levels and a late increase in LTB <sub>4</sub> and TBARS levels	
Mills, 2008 [20]	8-isoprostane nitrotyrosine	Experimental	CAPs (190 ± 37 µg/m <sup>3</sup> ) for 2 h	12 male patients with stable coronary heart disease and 12 male non-smoking volunteers	8-isoprostane levels increased 6 and 24 h after CAPs exposure, whereas nitrotyrosine levels did not significantly differ between exposures MDA increase 40% after low exposure and 208% after high exposure No PVOC significant changes	
Rundell, 2008 [29]	MDA	Experimental	PM <sub>1</sub>	12 non-asthmatics males (20.5 ± 2.45 years)		
Hubbard, 2009 [21]	PVOC	Experimental	DE 100 µg/m <sup>3</sup> for 1 h	11 healthy non-smokers (18–40 years)		
Hussain, 2012 [22]	pH Nitrite Nitrate	Experimental	DE 300 µg/m <sup>3</sup> for 1 h	16 non-smoking asthmatics (20–48 years)	Nitrite increase	
McCreaor, 2007 [23]	pH	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub>	60 asthmatics (19–55 years)	pH decrease	-2, 3 and 6 h
Barraza-Villarreal, 2008 [13]	pH	Environmental	Pers. PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub>	158 asthmatic and 50 non-asthmatic schoolchildren (7–11 years)	pH decrease	0, 4 and 5 days
Epton, 2008 [26]	pH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Environmental	O <sub>3</sub> Wood burning PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> PM <sub>1</sub>	93 schoolchildren (26 with asthma; 12–18 years)	No pH and H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> significant changes	0 h, 24 h and 1 week
Romieu, 2008 [18]	pH MDA	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	107 asthmatic children (mean age 9.5 years)	MDA increase related to air pollution exposure, lower lung function and augmented NAL IL8 levels No pH and LTB <sub>4</sub> significant changes	0, 1 and 2 days
Folino, 2009 [27]	pH LTB <sub>4</sub>	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> PM <sub>0.25</sub> Pers.	39 patients with myocardial infarction (45–65 years)		24 h
Zhang, 2009 [24]	pH free iron nitrite nitrate CO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> UFP	60 non-smoking asthmatics (18–55 years)	pH decrease	2, 3 and 6 h

**Tabella 2.** Sommario degli studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano biomarcatori del condensato dell'aria esalata. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.

Author, year	Biomarker	Exposure type	Pollutant(s)	Population (age)	Major findings	Lag
Liu, 2009 [30]	TBARS 8-isoprostane IL-6	Environmental	EC NO <sub>2</sub> Pers. PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	182 asthmatic children (9–14 years)	Increased TBARS but no 8-isoprostane and IL-6 significant changes	1, 2 and 3 days
Maestrelli, 2011 [28]	pH	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> Pers.	32 adult asthma (15–44 years)	No pH significant changes	24 h
Martins, 2012 [25]	pH	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> NO NO <sub>2</sub> CO O <sub>3</sub>	51 wheezing children (5–8 years)	pH decrease associated with PM <sub>10</sub> , NO <sub>2</sub> , benzene and ethylbenzene	5 days
Rava, 2012 [32]	Nitrite Nitrate	Environmental	BTEX PM <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	949 adults	Nitrite/nitrate decrease with O <sub>3</sub> only	
Manney, 2012 [31]	Glutathione NOx	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub>	111 asthmatics or COPD (36–85 years)	NOx increase associated with coarse particles	0, 1 and 2 days

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; PVOC, polar volatile organic compounds; MDA, malondialdehyde; NOx, total nitrite plus nitrate; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; Pers., personal monitoring; BTEX, benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes.

**Tabella 2 (continuazione).** Sommario degli studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano biomarcatori del condensato dell'aria esalata. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.

Da questi lavori emergono i problemi principali che limitano l'utilità dell'EBC, ovvero la diluizione variabile dei soluti con il vapore acqueo e la bassa concentrazione dei biomarcatori, che spesso risulta essere al di sotto del limite di rilevazione dei comuni saggi enzimatici. A causa della crescente sensibilità delle nuove tecniche di rilevazione anche la purezza dei campioni sta diventando un ostacolo importante [34]. Tranne i composti di azoto, i biomarcatori analizzati fino ad ora sono associati anche a cambiamenti nei parametri di funzionalità polmonare. Sicuramente l'identificazione nell'EBC di altri biomarcatori più sensibili all'esposizione acuta da traffico rappresenta una nuova sfida e richiede metodiche sofisticate quali la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa.

*c) FeNO.*

Tra i biomarcatori dell'aria esalata, merita una particolare attenzione il monitoraggio dell'NO esalato, essendo applicato dalla maggior parte degli studi in questo settore. L'NO esalato è elevato nei pazienti con asma non curato, si riduce con il trattamento con corticosteroidi e correla con gli eosinofili dell'espettorato. La metodologia per la misura dell'NO esalato (FeNO) è stata standardizzata sulla base di un consenso internazionale. I determinanti dei livelli di NO esalato sono ben caratterizzati e comprendono il fumo di sigaretta, l'assunzione di nitrati, la sensibilizzazione allergica, il trattamento con corticosteroidi, altezza, sesso ed età [47].

Tra i 33 lavori selezionati (Tabella 3), tre sono indicati come studi di esposizione sperimentale e curiosamente tutti e tre non hanno riscontrato significativi cambiamenti di FeNO in risposta all'esposizione di PM<sub>2.5</sub> o O<sub>3</sub> nei soggetti asmatici e sani [25, 37, 48].

D'altra parte la maggioranza degli studi osservazionali sia con monitoraggio ambientale che personale mostrano un alto FeNO associato all'aumento di una vasta gamma di sostanze inquinanti legate al traffico. Prestando attenzione alla popolazione analizzata si nota che la metà dei lavori pubblicati ha reclutato bambini [14, 16, 22, 23, 25-33] e tutti, tranne il lavoro di Liu et al. [45], hanno osservato un aumento di FeNO. Berhane et al. [66] hanno analizzato 2.240 bambini in età scolare e hanno dimostrato che l'inquinamento atmosferico è associato all'infiammazione delle vie respiratorie indipendentemente dall'asma e dallo stato di allergia. Un aumento di FeNO legato all'esposizione a PM<sub>2.5</sub>, PM 0.25, CO, NO<sub>x</sub>, SO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> è stato documentato anche in tre studi rivolti a soggetti anziani [2, 68, 69].

Quattro studi hanno arruolato adulti asmatici [38, 39, 43, 69]. Aumenti di FeNO in seguito ad esposizione al traffico sono stati dimostrati da Zhang et al. [39] e Jansen et al. [69], mentre Mc Creanor et al. [38] e Maestrelli et al. [43] non hanno rilevato alcun cambiamento significativo.

Secondo Strak et al. [70] l'esercizio durante l'esposizione al PM10 comporta un modesto aumento di FeNO. I ciclisti esposti a PM10, PM2.5 e particelle ultrafini (UFP), studiati da Jacobs et al. [73] non hanno mostrato variazioni significative sui livelli di FeNO, ma gli autori riconoscono che la causa potrebbe essere la ridotta numerosità dei soggetti partecipanti allo studio.

Cinque studi [25, 42, 43, 52, 53] hanno rilevato in seguito ad esposizione ad inquinamento urbano un aumento di FeNO senza cambiamenti nella funzionalità polmonare, mentre dieci lavori [39-41, 46, 48, 56, 59, 61] hanno riportato cambiamenti di FeNO concomitanti al peggioramento della funzionalità polmonare. È controverso se le misurazioni di FeNO consentono di rilevare un effetto dell'inquinamento dell'aria prima che sia evidente con i test di funzionalità respiratoria. Due studi non hanno osservato alcuna alterazione di FeNO né diminuita funzionalità polmonare [35, 38]. In nove studi, in aggiunta al FeNO non sono stati misurati i parametri respiratori [35, 45, 47, 50-52, 54, 58, 60].

Author, year	Biomarker	Exposure type	Pollutant(s)	Population (age)	Major findings	Sampling time
Nightingale, 1999 [10]	FeNO	Experimental	O <sub>3</sub> 0.2 ppm for 4 h	10 atopic asthmatics and 10 healthy volunteers (18–39 years)	No significant FeNO changes	
Newson, 2000 [36]	FeNO	Experimental	O <sub>3</sub> 0.2 ppm for 2 h	9 atopic asthmatics (21–42 years)	No significant FeNO changes	
Olin, 2001 [11]	FeNO	Experimental	O <sub>3</sub> 0.2 ppm for 2 h	11 healthy non-smoking volunteers (20–29 years)	No significant FeNO changes	
Frampton, 2004 [37]	FeNO	Experimental	UFP for 2 h Healthy+resting: 10 µg/m <sup>3</sup> Healthy+exercise: 10 then 25 µg/m <sup>3</sup> Asthma+exercise: 10 µg/m <sup>3</sup> UFP 100 µg/m <sup>3</sup> for 2 h	16 mild-to-moderate asthmatics and 24 healthy controls (18–40 years)	No significant FeNO changes	
Gong, 2008 [38]	FeNO	Experimental	UFP 100 µg/m <sup>3</sup> for 2 h	17 healthy volunteers (24 ± 8 years), 14 asthmatics (34 ± 12 years)	No significant FeNO changes	
Rundell, 2008 [29]	FeNO	Experimental	PM <sub>1</sub>	12 non-asthmatics male	FeNO decrease after high exposure	
Behndig, 2011 [39]	FeNO	Experimental	PM <sub>10</sub> 100 µg/m <sup>3</sup> for 2 h	32 asthmatics and 23 healthy controls (18–45 years)	No significant FeNO changes	
Hussain, 2012 [22]	FeNO	Experimental	PM <sub>2.5</sub> 300 µg/m <sup>3</sup> for 1 h	16 non-smoking asthmatics (20–48 years)	No significant FeNO changes	
Van Amsterdam, 1999 [63]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> , NO, NO <sub>2</sub> CO SO <sub>2</sub>	16 non-smoking healthy subjects (29–38 years)	FeNO increase	Day 0
Steenberg, 2001 [12]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> , NO, NO <sub>2</sub> CO, SO <sub>2</sub> BS	126 children (8–13 years of age)	FeNO increase	1, 3 and 6 days
Fischer, 2002 [41]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> NO CO	68 schoolchildren (10–11 years of age)	FeNO increase	1 and 2 days
Koenig, 2003 [42]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> Pers.	19 children (6–13 years of age)	FeNO increase	Day 0
Adamkiewicz, 2004 [52]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>x</sub> SO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	29 non-smoking elderly (53–91 years), among them 8 COPD and 7 asthmatics	FeNO increase	24 h
Jansen, 2005 [55]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> NO NO <sub>2</sub> Pers.	16 asthmatics or COPD or both (60–86 years of age)	FeNO increase	24 h
Koenig, 2005 [43]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> Pers.	19 asthmatic children (6–13 years)	FeNO increase	Day 0
Mar, 2005 [44]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub>	19 asthmatic children (6–13 years)	FeNO increase	10–12 h
Delfino, 2006 [45]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> PM <sub>2.5</sub> EC OC NO <sub>2</sub> Pers.	45 schoolchildren with persistent asthma (9–18 years)	FeNO increase	0, 1 and 2 days
Adar, 2007 [54]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> Pers.	44 non-smokers in bus trip (62–94 years of age)	FeNO increase	6 and 24 h

**Tabella 3.** Sommario degli studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano il FeNO. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.

Author, year	Biomarker	Exposure type	Pollutant(s)	Population (age)	Major findings	Sampling time
Holgüin, 2007 [46]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub>	200 children with or without asthma (6–12 years of age)	FeNO increase in asthmatics	2 days
McCreanor, 2007 [18]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub> Pers.	60 asthmatics (19–55 years)	No significant FeNO changes	0, 5 and 24 h
Murata, 2007 [47]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO NO <sub>2</sub> Pers.	19 children (5–10 years of age)	FeNO increase	24 h
Allen, 2008 [48]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> sulphur LAC LG Pers.	19 asthmatic children (6–13 years of age)	FeNO increase	1 day
Barraza-Villalreal, 2008 [13]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	158 asthmatic and 50 non-asthmatic schoolchildren (7–11 years)	FeNO increase	0, 4 and 5 days
Folino, 2009 [27]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> PM <sub>0.25</sub> Pers.	39 patients with myocardial infarction (45–65 years)	No significant FeNO changes	24 h
Khatri, 2009 [62]	FeNO	Environmental	O <sub>3</sub>	38 asthmatics and 13 healthy control subjects	Higher FeNO levels in asthmatics	2 days
Liu, 2009 [30]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	182 asthmatic children (9–14 years of age)	No significant FeNO changes	1, 2 and 3 days
Renzetti, 2009 [14]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> CO benzene	37 untreated allergic children with mild persistent asthma (7 years of age or older)	FeNO increase with decreased lung function	7 days
Zhang, 2009 [24]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> UFP CO EC NO <sub>2</sub> Pers.	60 non-smoking asthmatics (18–55 years of age)	FeNO increase associated with EC	2, 3, 4, 5, 6, 7 and 22 h after exposure
Delfino, 2010 [53]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5-0.25</sub> PM <sub>0.25</sub> CO NO <sub>x</sub> O <sub>3</sub>	60 elderly (65–90 years)	FeNO increase positively associated with PM <sub>0.25-2.5</sub> and O <sub>3</sub>	5 days
Klepczynska Nystrom, 2010 [57]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> UFP NO NO <sub>2</sub> Pers.	20 healthy non-smokers (18–46 years)	No significant FeNO changes between subway and control exposures	14 h
Jacobs, 2010 [59]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> UFP Pers.	38 cyclist (18–65 years)	No significant FeNO changes	30 min
Larsson, 2010 [15]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> 183 µg/m <sup>3</sup> PM <sub>10</sub> 80 µg/m <sup>3</sup> NO 711 µg/m <sup>3</sup> NO <sub>2</sub> 265 µg/m <sup>3</sup> CO 3.2 mg/m <sup>3</sup> for 2 h	14 mild asthmatic and the majority with allergy (18–55 years)	No significant FeNO changes	7 h
Strak, 2010 [56]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub>	12 cyclists (23–57 years)	FeNO increase weakly	6 h
Maestrelli, 2011 [28]	FeNO	Environmental		32 adult asthma (15–44 years)	No significant FeNO changes	24 h

**Tabella 3 (continuazione).** Sommario degli studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano il FeNO. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.

Author, year	Biomarker	Exposure type	Pollutant(s)	Population (age)	Major findings	Sampling time
Zuurbier, 2011 [60]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> Pers.	34 healthy non-smoking adults (18–56 years)	FeNO increase modestly	6 h
Lin, 2011 [49]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> BC	8 asthmatic and 28 non-asthmatic children (9–12 years)	FeNO increase associated with BC	24 h
Berhane, 2011 [51]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5</sub> PM <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2240 subjects	FeNO increase	1 and 7 days
Graveland, 2011 [64]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub>	812 children (7–11 years)	FeNO increase	0, 1, 2 and 3 days
Klepczynska Nystrom, 2012 [58]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> UFP NO NO <sub>2</sub> Pers.	16 mild asthmatics (18–52 years)	No significant FeNO changes between subway and control exposures	14 h
Weichenthal, 2012 [61]	FeNO	Environmental	VOC Pers.	42 healthy non-smoking adults (19–58 years)	FeNO increase	1–4 h
Martins, 2012 [25]	FeNO	Environmental	PM <sub>10</sub> PM <sub>2.5</sub> NO NO <sub>2</sub> CO O <sub>3</sub> BTEX	51 wheezing children (5–8 years)	FeNO increase associated only with ethylbenzene	5 days
Sarnat, 2012 [50]	FeNO	Environmental	PM <sub>2.5–10</sub> PM <sub>2.5</sub> BC NO <sub>2</sub>	58 asthmatic children (6–12 years)	FeNO increase	2 and 4 days

BS, black smoke; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; EC, elemental carbon; LAC, light absorbing carbon; LG, levoglucosan; JFP, ultra-fine particulate; OC, organic carbon; BTEX, benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes; Pers., personal monitoring.

**Tabella 3 (continuazione).** Sommario degli studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano il FeNO. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.

Nel complesso la maggior parte degli studi ha trovato una correlazione tra il FeNO e gli inquinanti legati al traffico, anche se le stime degli effetti sono piccoli; poiché il FeNO rappresenta un marker di infiammazione delle vie aeree, questo suggerirebbe che l'inquinamento atmosferico aumenti l'infiammazione polmonare. Il FeNO viene spesso considerato come un surrogato per l'eosinofilia delle vie aeree. Tuttavia deve essere sottolineato che il FeNO non può essere utilizzato in modo intercambiabile con il conteggio degli eosinofili nell'espettorato poiché il FeNO è elevato in numerose altre condizioni [62]. La misurazione del FeNO non distingue tra componenti bronchiale e alveolare. I parametri indipendenti di flusso possono fornire maggiori informazioni sull'NO polmonare [63]. Come suggerito dalla Task Force dell'European Respiratory Society [37], la partizione dell'NO esalato nelle vie aeree centrali e nelle frazioni periferiche potrebbe essere più utile per monitorare l'asma e la BPCO, ma questa analisi approfondita del FeNO non è stata ancora applicata su studi riguardanti l'inquinamento atmosferico.

*d) Espettorato indotto.*

La maggior parte delle osservazioni inizialmente fatte sulle pneumopatie erano state ricavate utilizzando il broncoscopio a fibre ottiche in associazione con il lavaggio broncoalveolare e con le biopsie polmonari. Il carattere invasivo di questa tecnica restringe l'impiego della broncoscopia a un numero limitato di centri specializzati, non permettendo quindi che essa diventi una tecnica diagnostica utilizzabile per il medico nella pratica quotidiana. Inoltre, non è facile applicare la broncoscopia in studi clinici su larga scala. La possibilità di studiare le pneumopatie è cambiata in modo considerevole grazie all'utilizzo dell'espettorato indotto come strumento di ricerca applicabile anche nella pratica clinica. Tale metodica risulta inoltre confrontabile ad altre tecniche invasive come il lavaggio broncoalveolare e la biopsia [64].

L'espettorato indotto è una procedura semi-invasiva, sicura e ripetibile che è stata impiegata sia in soggetti sani che malati. L'espettorato indotto consiste nell'inalazione di un aerosol di soluzione salina per un determinato periodo di tempo e nella produzione di espettorato. L'espettorato indotto richiede un elevato grado di cooperazione da parte del paziente ed è difficile da eseguire nei bambini. L'induzione deve essere effettuata da tecnici adeguatamente addestrati o infermieri con esperienza sufficiente con il protocollo, sempre sotto la supervisione di un medico esperto e dovrebbero essere disponibili attrezzature per la rianimazione [65]. Un problema notevole è la possibilità che l'induzione stessa o l'elaborazione successiva dell'espettorato attivi le cellule infiammatorie delle vie aeree. Inoltre, quando vengono misurati mediatori solubili è importante tener conto della possibile interferenza dovuta a reagenti riducenti, come il ditiotreitolo (DTT), impiegato nella processazione [66].

Dieci articoli riportano l'impiego dell'espettorato indotto (IS) al fine di studiare gli effetti acuti dell'esposizione a traffico urbano e sette di essi descrivono esposizioni controllate con l'impiego di camere di esposizione (Tabella 4). Gli studi effettuati da Hiltermann et al. [83] e Nightingale et al. [25] hanno analizzato gli effetti dell'O<sub>3</sub> negli asmatici. Hiltermann et al. [83] suggeriscono che gli eosinofili, piuttosto che i neutrofili, abbiano un ruolo patogenetico nell'iperreattività delle vie aeree indotta da O<sub>3</sub>. D'altra parte, Nightingale et al. [25] mostrano che l'esposizione all'O<sub>3</sub> porta ad una risposta infiammatoria dei neutrofili nei soggetti normali e asmatici. La discrepanza può essere dovuta alla diversa tempistica prevista dai protocolli di studio per l'espettorato: nel primo lavoro sopra citato l'espettorato è stato eseguito 16 ore dopo l'esposizione [83], mentre nel secondo lavoro 4 ore dopo [25].

Altri tre studi di esposizione sperimentale sono focalizzati esclusivamente sugli effetti di particelle di scarico diesel (DEP) [84, 85]. È interessante notare che il numero di neutrofili risulta aumentato nei volontari sani dopo esposizione a DEP [84, 85], invece non emerge nessun cambiamento nella conta dei neutrofili negli asmatici atopici [53]. Invece sono stati osservati livelli elevati di IL-6 nel surnatante ottenuto dalla processazione dell'IS sia nei volontari sani [85] che negli asmatici [86] in seguito ad esposizione a DEP.

Alexis e collaboratori [91] hanno dimostrato che non è necessaria la presenza di endotossina sulle PM<sub>10-2.5</sub> per aumentare il numero di neutrofili in seguito ad esposizione a PM, ma è essenziale per indurre rilascio di citochine dai macrofagi alveolari.

Il lavoro di Bosson et al. [92] considera per la prima volta l'effetto dell'aggiunta di O<sub>3</sub> all'esposizione di DEP. Questo lavoro ha dimostrato che l'esposizione all'O<sub>3</sub> potrebbe amplificare la risposta infiammatoria indotta da DEP in quanto gli autori hanno trovato un maggior numero di neutrofili e aumentati livelli di mieloperossidasi nell'espettorato dopo l'esposizione combinata.

Tra gli studi di esposizione ambientale, sia lo studio di Mc Creanor et al. [38] che quello di Zhang et al. [39] nei soggetti asmatici oltre ad effettuare la conta cellulare differenziale hanno misurato l'IL-8, la mieloperossidasi e la proteina cationica eosinofila. Entrambi hanno osservato un'infiammazione neutrofilica dopo l'esposizione a traffico urbano. Secondo Chimenti et al. [93] l'esercizio e l'esposizione ambientale a PM<sub>10</sub> e O<sub>3</sub> influenzano l'apoptosi delle cellule delle vie aeree. L'apoptosi dei neutrofili è aumentata con l'inalazione di inquinanti ambientali, mentre l'apoptosi delle cellule epiteliali bronchiali aumentata dopo un intenso esercizio fisico.

Il carico di carbone nei macrofagi dell'IS è stato utilizzato da alcuni ricercatori per valutare l'esposizione individuale a combustibili da biomassa [94, 95] e PM<sub>10</sub> [96-98]. Mentre inizialmente gli studi erano rivolti solo ai bambini [94, 96, 97], successivamente uno studio ha valutato il carico di carbone in adulti sani e un altro è stato condotto negli adulti non fumatori con diabete [98]. Nel

complesso gli autori concordano sul fatto che il carico di carbone nei macrofagi dell'IS è un marcatore promettente per valutare l'assunzione individuale delle particelle di carbone inalate. Come osservato da Nwokoro et al. [5], tuttavia, non è ancora noto se il carbone nei macrofagi alveolari possa riflettere la dose inalata in settimane, mesi o anche anni.

Tutti insieme questi studi dimostrano che l'IS è un'ottima fonte sia di cellule che di mediatori extracellulari nel surnatante, ma i lavori finora pubblicati riguardano come popolazione oggetto di studio solo adulti.

Author, year	Biomarker	Exposure type	Pollutant(s)	Population (age)	Major findings	Lag
Frampton, 2004 [37]	Cell count IL-6 IL-8	Experimental	UFP for 2 h Healthy+resting: 10 µg/m <sup>3</sup> Healthy+exercise: 10 then 25 µg/m <sup>3</sup> Asthma+exercise: 10 µg/m <sup>3</sup>	16 mild-to-moderate asthmatics and 24 healthy controls (18–40 years)	Increased macrophage % in asthmatics but IL-6 and IL-8 unaffected by UFP exposure	
Ajromandi, 2005 [71]	Cell count	Experimental	O <sub>3</sub> 0.2 ppm for 4 h	13 asthmatics (21–45 years)	Increases in both the concentration of neutrophils and the %PMNs	
Alexis, 2006 [79]	mCD14 CD11b HLA-DR CD64 CD16	Experimental	PM <sub>2.5-10</sub> 70 µg/m <sup>3</sup> for 24 h	9 healthy volunteers (18–35 years)	Biological material on coarse fraction of PM increases % of PMN, macrophage mRNA TNF- $\alpha$ , eotaxin, up-regulated immune surface phenotypes on macrophages and monocytes phagocytosis Increase in the neutrophils %	
Ratto, 2006 [72]	Cell count Total protein LDH Fibrinogen IL-6 IL-8	Experimental	O <sub>3</sub> 0.4 ppm for 2 h	15 healthy non-smoking volunteers (20–31 years)		
Bosson, 2007 [80]	Cell count MPO MMP-9 IL-6	Experimental	PM 300 µg/m <sup>3</sup> for 1 h O <sub>3</sub> 0.2 ppm for 2 h	16 healthy non-smoking volunteers (20–28 years)	Increased neutrophils and MPO	
Gong, 2008 [38]	Cell count Total protein IL-4 IL-6 IL-8 IL-10 IL-13 GM-CSF Interferon TNF	Experimental	UFP 100 µg/m <sup>3</sup> for 2 h	17 healthy volunteers (24 $\pm$ 8 years), 14 asthmatics (34 $\pm$ 12 years)	Not significant changes	
Hernandez, 2010 [73]	Cell count CD11b CD14 CD86	Experimental	O <sub>3</sub> 0.4 ppm for 2 h	25 healthy volunteers, 14 atopic non-asthmatic subjects and 11 atopic asthmatic subjects	Atopic asthmatics have increased airway inflammatory response	

**Tabella 4.** Sommario degli studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano l'espettorato indotto. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.

Author, year	Biomarker	Exposure type	Pollutant(s)	Population (age)	Major findings	Lag
	TLR4 FceRI CD23 HLA-DRHA					
McCreanor, 2007 [18]	Cell count IL-8 MPO ECP	Environmental	PM <sub>2.5</sub> NO <sub>2</sub> Pers.	60 asthmatics (19–55 years)	Increased neutrophils	24 h
Zhang, 2009 [24]	Cell count IL-8 MPO ECP	Environmental	PM <sub>2.5</sub> UFP CO EC NO <sub>2</sub> Pers.	60 non-smoking asthmatics (18–55 years)	Increased neutrophils and MPO	22 h
Chimentì, 2009 [81]	Cell count TUNEL TNF $\alpha$ IL-8	Environmental	PM <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	9 runners (36–44 years)	Increased neutrophils apoptosis	20 h

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; MPO, myeloperoxidase; Gro- $\alpha$ , growth-related oncogene- $\alpha$ ; ECP, eosinophilic cationic protein; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ ; EC, elemental carbon; M-hist, methylhistamine; DEP, diesel exhaust particles; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HA, hyaluronic acid; LDH, lactate dehydrogenase; Pers., personal monitoring; UFP, ultra-fine particulate.

**Tabella 4 (continuazione).** Sommario degli studi riguardanti gli effetti a breve termine dell'esposizione all'inquinamento urbano che analizzano l'espettorato indotto. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.

## CONCLUSIONI

I metodi utilizzati per valutare gli effetti a breve termine dell'inquinamento atmosferico traffico relativo variano a seconda del comparto del tratto respiratorio da esaminare.

Dal lavaggio nasale si ottengono cellule e mediatori solubili utili per studiare le vie aeree superiori. Le vie aeree inferiori e centrali invece possono essere esaminate utilizzando NAL, IS, EBC e FeNO. In tabella 5 viene presentata una sintesi dell'utilità dei biomarcatori principali nel rilevare gli effetti acuti dell'inquinamento atmosferico secondo l'età dei partecipanti (adulti *vs* bambini), lo stato di malattia (sano *vs* asma-atopia), la loro sensibilità rispetto ai test di funzionalità polmonare e la loro specificità per un tipo di inquinante.

Nei campioni di NAL, un aumento dei livelli di IL-8 nei bambini è positivamente associato con l'inalazione di PM e degli inquinanti gassosi [27, 28, 33], e l'alterazione nel NAL della cellularità o dei livelli di citochine è concomitante con un peggioramento respiratorio osservato dai parametri di funzionalità polmonare.

La raccolta del condensato dell'aria esalata è pratica in studi che coinvolgono gran numero di pazienti. L'esposizione a traffico porta a acidificazione del pH, ma la identificazione di molecole più specifiche nell'EBC all'esposizione all'inquinamento atmosferico rappresenta ancora una sfida. L'MDA sembra un indicatore utile per lo studio dello stress ossidativo collegato all'inquinamento atmosferico sia in soggetti asmatici che in non asmatici indipendentemente dall'età [33, 34, 44, 45]. L'utilità della misurazione del FeNO è riconosciuta sia per adulti che per bambini. Tuttavia, è controverso se i cambiamenti nel FeNO sono rilevabili prima dell'insorgenza di peggioramento della funzione polmonare. La partizione dell'NO esalato nelle vie aeree e nelle frazioni alveolari potrebbe essere un strumento più sensibile per individuare il luogo del danno polmonare dovuto a aumenti nel livello di inquinamento atmosferico.

Gli studi esaminati hanno mostrato un'associazione tra l'inquinamento da traffico e un aumento dei neutrofili dell'espettorato. Dagli studi basati sull'esposizione sperimentale, vi è solo una moderata evidenza che l'analisi dell'IS sia più sensibile dei test di funzionalità polmonare. Inoltre, l'IS può essere utile nella valutazione di l'esposizione a PM in termini di carico di particelle a livello polmonare misurando il contenuto di carbonio nei macrofagi alveolari [5, 94-98].

Sia nel tratto respiratorio superiore (NAL) e che nelle vie aeree inferiori (IS) sono state misurate le cellule e alcune citochine (IL-6, IL-8 e MPO). In generale, la risposta all'esposizione da traffico sembra diversa nei due comparti. Non sono state rilevate variazioni rilevanti nella conta delle cellule nel NAL, al contrario, nella parte bassa delle vie respiratorie predomina la risposta neutrofila [39, 92]. La misurazioni di IL-6 non danno risultati consistenti dopo l'esposizione all'inquinamento

atmosferico: uno solo studio riporta un'aumentata concentrazione di IL-6 di IS in volontari sani dopo l'esposizione a DEP [72]. Dei livelli aumentati di IL-8 sono stati rilevati in alcuni studi ambientali nel NAL [28, 33], ma non nei campioni di IS. Infine, mentre i livelli di MPO nel NAL sono influenzati dall'esposizione a ozono, l'MPO aumenta nella maggior parte degli studi che adottano il campionamento mediante IS.

Sebbene i soggetti con BPCO siano stati generalmente considerati a più alto rischio per gli effetti negativi degli inquinanti atmosferici, questi pazienti sono stati reclutati solo in pochi studi [1-4]. Secondo Manney et al. [46], l'aumento di nitrati e nitriti nell'EBC è stato associato con una grossa esposizione di particelle nei soggetti con BPCO e asmatici, senza differenze significative tra le due malattie. Le misure di FeNO in altri due studi hanno dato risultati opposti: uno ha trovato un rapporto con PM<sub>2.5</sub> in soggetti con BPCO, ma non con asmatici [2], mentre nell'altro [3], il FeNO è stato associato con livelli di inquinamento da PM nei partecipanti con asma ma non in quelli con BPCO. Secondo Gong et al. [53] la cellularità dell'espettorato indotto in soggetti con BPCO non è influenzata dall'esposizione a particolato. Sono quindi necessarie nuove ricerche volte a chiarire l'effetto dell'inquinamento atmosferico acuto legato al traffico in soggetti che soffrono di malattie polmonari diverse dall'asma.

Il monitoraggio a breve termine dell'esposizione può fornire degli indizi per valutare la dose di inquinanti atmosferici inalati a lungo termine quando il comportamento è abituale [5]. Tuttavia, gli effetti acuti sulla salute sono difficili da attribuire ad un particolare inquinante nella maggior parte delle indagini con esposizione ambientale. Come sottolineato da Zhang [39], le concentrazioni misurate di inquinanti possono semplicemente rappresentare l'esposizione a tutta la strada, che comprende non solo inquinanti misurati in questo studio, ma anche altri inquinanti nella miscela di DEP e nelle particelle grossolane risospese dalla polvere della strada, come detriti di motore e residui di pneumatici. L'accuratezza della relazione esposizione-risposta può essere ridotta di una errata classificazione dell'esposizione [43]. In realtà, molti ricercatori hanno fatto affidamento su misurazioni di PM da siti fissi, che potrebbero non corrispondere all'esposizione individuale. Solo un numero limitato di studi ha esaminato l'associazione tra l'esposizione personale al PM e gli effetti sulla salute in adulti asmatici [38, 39, 43, 57, 60, 63, 69, 72]. Ulteriori ricerche dovrebbero essere dirette a promuovere una migliore standardizzazione dei metodi per monitorare gli inquinanti da traffico. Va ricordato che, in condizioni di vita reale, i soggetti 'non esposti' non esistono e la differenza tra i livelli minimi e massimi di inquinamento atmosferico è spesso meno di tre volte [6]. Dovrebbe essere stabilita, in particolare quando si pianificano studi osservazionali, una base di riferimento per i livelli di marcatori infiammatori in soggetti esposti a bassi livelli di sostanze inquinanti per essere in grado di rilevare un effetto con esposizioni più elevate.

Questa rassegna della letteratura corrente mette in luce la complessità di questo campo di ricerca, evidenzia il significato di studi a breve termine sull'inquinamento atmosferico da traffico e dà consigli importanti quando si pianificano studi per rilevare gli effetti respiratori acuti dell'inquinamento in modo non invasivo.

Biomarker	Suitability in children	Suitability in adults	Healthy vs. asthma-atopy	More sensitive than lung function	Specificity for a type of pollutant
NAL <sup>†</sup> (cells, cytokines)	Yes (***) strong evidence)	Yes (*: limited evidence)	No disease specific (**: moderate evidence)	No (***) strong evidence)	No (**: moderate evidence)
EBC pH <sup>†</sup>	Yes (**: moderate evidence)	No (*: contradictory evidence)	No disease specific (***: strong evidence)	No (***) strong evidence)	No (***: strong evidence)
FeNO <sup>†</sup>	Yes (***) strong evidence)	Yes (***: strong evidence)	No disease specific (***: strong evidence)	No (*: contradictory evidence)	No (***: strong evidence)
IS <sup>‡</sup> (cells, cytokines)	No (-: no evidence)	Yes (***: strong evidence)	No disease specific (**: moderate evidence)	Yes (**: moderate evidence)	No (**: moderate evidence)

The statements were graded according to the Royal College of General Practitioners (RCGP) three-star system (-: no scientific evidence; \*: limited/contradictory evidence; \*\*: moderate evidence; \*\*\*: strong evidence).

<sup>†</sup>Based on environmental exposure studies.

<sup>‡</sup>Based on experimental exposure studies.

**Tabella 4.** Sommario sull'utilità dei principali biomarcatori nell'individuare gli effetti acuti dell'esposizione all'inquinamento urbano secondo l'età dei soggetti, lo stato di malattia, la loro sensibilità rispetto ai test respiratori e la loro specificità per un tipo di inquinante. Tratto da Scarpa MC et al. *Clinical and Experimental Allergy* 2014; 44:1100-1118.



## **PARTE II**

### Determinanti dell'accumulo delle particelle carboniose nei macrofagi delle vie aeree

#### **INTRODUZIONE**

L'atmosfera terrestre è una miscela di gas presenti in concentrazioni diverse. La composizione percentuale in volume di aria secca vicino al livello del mare è 78,1% di azoto, 20,9 % di ossigeno e 0,93 % di argon. Vi sono inoltre altre sostanze presenti in concentrazioni molto inferiori quali: anidride carbonica, idrogeno, elio, metano, kripton, neon, ozono e vapore acqueo. L'inquinamento dell'atmosfera è un'alterazione delle sue naturali caratteristiche causata da agenti chimici, fisici e biologici, che vengono indicati col nome di "inquinanti atmosferici". Gli inquinanti atmosferici sono sostanze che alterano la normale composizione chimica dell'aria, con conseguenze sulla salute dell'uomo e dell'ambiente [99]. Le sostanze inquinanti possono essere molto differenti tra di loro nelle proprietà chimico-fisiche e vengono comunemente classificate come inquinanti primari o secondari in base alle modalità di formazione. Gli inquinanti primari vengono immessi come tali direttamente nell'atmosfera; gli inquinanti secondari si formano da reazioni chimiche che avvengono nell'atmosfera tra inquinanti primari o tra composti normalmente presenti in essa (soprattutto ossigeno e acqua) [99].

L'inquinamento dell'aria è determinato da due categorie di sostanze: gli inquinanti gassosi e il particolato atmosferico (particulate matter, PM). I primi includono il diossido di azoto ed altri ossidi di azoto (NO<sub>2</sub> e NO<sub>x</sub>), monossido di carbonio (CO), anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), ozono (O<sub>3</sub>), diossido di zolfo (SO<sub>2</sub>), e VOC. Il secondo gruppo è rappresentato da particelle solide, costituite da una complessa miscela di sostanze diverse tra cui carbonio organico [18], composti inorganici come solfati e nitrati, ossidi di metalli pesanti, sali solubili, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e materiale biologico comprendente pollini, batteri e spore [99].

La classificazione più utilizzata del particolato considera le dimensioni delle particelle, e in particolare il diametro aerodinamico. In tal modo si identificano:

- PM<sub>10</sub> o frazione inalabile, particelle di diametro inferiore a 10 µm;
- PM<sub>2,5</sub>, particelle con diametro inferiore a 2,5 µm;
- PM<sub>0,1</sub> o PM ultrafine, particelle con diametro inferiore ai 0,1 µm;

Il deposito di particelle inalate lungo le vie aeree dipende dalla loro misura: particelle con diametro tra 10 µm e 2,5 µm si depositano preferenzialmente nelle vie aeree prossimali mentre particelle fini e ultrafini (meno di 2,5 µm e 0,1 µm) si depositano soprattutto nel tratto distale e negli alveoli [99].

Sulla base delle sorgenti di emissione, il PM può essere suddiviso in tre categorie:

- particolato primario originato dalla combustione incompleta nei motori dei veicoli o dagli impianti di combustione fissi;
- particolato secondario che si forma nell'atmosfera, ovvero solfato d'ammonio, nitrato d'ammonio ed aerosol organici secondari; poiché le particelle di particolato secondario si formano in modo relativamente lento, il loro contributo al PM10 è più uniformemente distribuito nello spazio;
- particelle grossolane, dette "*coarse particles*", che includono materiale naturale e biologico (es. spore e pollini) [6].

L'inquinamento atmosferico può derivare da attività umane o da fonti naturali. Gli inquinanti atmosferici possono provenire da molteplici attività umane. Tra queste ricordiamo:

- trasporti stradali, in relazione al tipo di veicolo e al carburante utilizzato cambiano gli inquinanti emessi e le loro quantità;
- riscaldamento domestico, soprattutto nell'area urbana (gli inquinanti emessi dipendono dal combustibile utilizzato e dalla tipologia dell'impianto di riscaldamento);
- industrie e attività artigianali. In questa categoria gli inquinanti emessi variano in relazione alle diverse lavorazioni. Tutti i processi di combustione o metallurgici e molte altre operazioni industriali conducono all'emissione di particelle nell'atmosfera.

Le polveri dal suolo che entrano nell'atmosfera per sospensione attuata dal vento rientrano tra le fonti naturali così come le eruzioni vulcaniche, gli incendi e alcuni processi biologici, come gli allergeni [6].

Le sorgenti di inquinanti ambientali possono essere di tipo puntiforme, lineare o diffuse. L'aggettivo "puntiforme" si riferisce a fonti che appaiono come punti nella distribuzione territoriale delle emissioni. Così, per esempio, una centrale energetica dovrebbe essere considerata una fonte puntiforme nonostante abbia più di una ciminiera. Poiché i veicoli stradali e i treni ferroviari in genere viaggiano lungo rotte comuni, costituiscono una fonte definita "lineare" di inquinamento. Molte fonti di emissioni non si adattano né a modelli puntiformi, né a quelli lineari. Piuttosto, esse sono più diffuse e distribuite quindi su un'area significativa. Un esempio potrebbe essere costituito dalle emissioni di caldaie utilizzate per il riscaldamento in aree residenziali, in cui ciascuna delle case avente la propria caldaia costituisce una piccola fonte di emissione. Tipicamente vengono considerate come una fonte omogenea di inquinanti, proveniente in maniera diffusa dall'area considerata e non come singole fonti puntiformi.

Le sorgenti di emissione possono essere classificate anche in continue e discontinue, in base alla loro modalità di funzionamento nel tempo, e in fisse e mobili, a seconda della loro più o meno fissa dislocazione nello spazio [99].

### **Meccanismo d'azione degli inquinanti atmosferici**

Gli inquinanti dell'aria esercitano un effetto negativo sull'apparato respiratorio secondo molteplici meccanismi, tra questi il principale è lo stress ossidativo. A causa dell'ampia area di contatto tra la superficie del sistema respiratorio e l'ambiente, le elevate concentrazioni di ossidanti e pro-ossidanti presenti negli inquinanti atmosferici, una volta in contatto con l'epitelio respiratorio, determinano la formazione di radicali liberi dell'ossigeno e dell'azoto, causando così una condizione di forte stress ossidativo nelle vie aeree. Il danno che ne deriva causa l'instaurarsi di un quadro flogistico con il reclutamento di cellule infiammatorie (macrofagi, polimorfonucleati, linfociti, monociti, basofili, piastrine, mastociti, fibroblasti) e mediatori (citochine, chemochine, molecole di adesione). Lo stato infiammatorio non rimane confinato all'apparato respiratorio, ma causa anche effetti sistemici e deleteri su vari organi [6, 99].

Gli studi epidemiologici riportano un'elevata incidenza di effetti acuti osservabili sulla popolazione subito dopo l'aumento (1-2 ore), anche temporaneo, della concentrazione di PM nell'aria. Per spiegare la rapidità degli aggravamenti della malattia coronarica e delle alterazioni metaboliche, è stato ipotizzato che il PM interagisca con recettori localizzati nell'albero bronchiale i quali, se stimolati da fattori chimici e fisici, evocano riflessi simpatici mediati centralmente con effetti sulla regolazione nervosa dell'attività cardiaca (frequenza cardiaca). È noto che i recettori vagali broncopolmonari, quali le terminazioni delle fibre-C, sono responsabili dei riflessi agli irritanti respiratori, tra i quali ad esempio la tosse [100]. Pertanto l'alterazione simpatica e parasimpatica dell'attività cardiaca è influenzata da riflessi mediati centralmente attraverso le fibre-C non mielinizzate del vago attivate dal PM. In tal modo può essere spiegata la riduzione della variabilità di frequenza cardiaca dopo breve tempo dall'esposizione a PM [61].

### **PM10 e Black Carbon**

Il "*Black Carbon*" (BC) è la componente principale del PM10 ed è il parametro principalmente utilizzato per misurare e controllare l'inquinamento atmosferico da particelle sospese [101]. Il BC è formato da un nucleo, costituito da aggregati di carbonio elementare soprattutto in forma amorfa arricchito di metalli pesanti e da una parte superficiale di componenti organici a bassa volatilità [102]. Viene emesso direttamente dalla combustione di combustibili fossili e biomasse e viene prodotto quando la quantità di ossigeno è insufficiente, oppure quando la temperatura della fiamma è bassa. La formazione di particolato dipende dalla pressione del sistema, dal tipo di combustibile (premiscelato o non con il comburente) e dalla formazione di turbolenze all'interno della fiamma [102].

### **Esposizione personale all'inquinamento urbano mediante determinazione del carico di carbone nei macrofagi alveolari.**

Le particelle carboniose inalate sono fagocitate prevalentemente dai macrofagi delle vie aeree. Nelle persone adulte il quantitativo di particelle carboniose, rilevate in campioni polmonari autoptici mediante microscopia elettronica, riflette l'esposizione a lungo termine a PM ambientale inalabile [106]. Lo studio condotto da Brauer ha dimostrato che l'esposizione e/o la residenza a lungo termine in un'area con elevate concentrazioni di particolato ambientale è associata con un maggior numero di particelle carboniose trattenute nel tessuto polmonare, ed in particolar modo alla presenza di aggregati particellari di grandi dimensioni che originano dai prodotti della combustione. Kulkarni e collaboratori [94] hanno confrontato il BC dei macrofagi delle vie aeree in donne e bambini etiopi esposti a particolato da biomasse con soggetti adulti inglesi della città di Leicester. È stato dimostrato che il carico nelle donne africane esposte al fumo da combustione di biomassa è di circa 13 volte maggiore rispetto agli adulti inglesi, dove la maggior parte delle particelle inalate derivano dall'uso di combustibili fossili [94].

Uno studio, nel 2006, ha stabilito un'associazione dose-dipendente inversa tra il contenuto di BC nei macrofagi e la funzionalità polmonare in bambini sani e asmatici. La quantità di BC contenuto nei macrofagi delle vie aeree era minore nei bambini con asma rispetto ai sani, nonostante questi ultimi fossero esposti a livelli di PM superiori, suggerendo che la fagocitosi delle particelle carboniose da parte dei macrofagi possa essere alterata nell'asma [16].

Fullerton e collaboratori [95] hanno osservato in volontari adulti sani, che il BC dei macrofagi è associato con l'utilizzo di biomasse in ambienti chiusi, sottolineando l'importanza dell'inquinamento *indoor*. Nel 2010, Jacobs e collaboratori hanno valutato se l'esposizione a PM potesse influire sullo stato protrombotico e sulla funzionalità piastrinica in una coorte di soggetti diabetici. In questo studio la valutazione dell'esposizione prevedeva sia un'analisi dei livelli di PM<sub>10</sub> e PM<sub>2,5</sub> mediante modelli di dispersione, sia misurazioni personali ottenute tramite analizzatori portatili. I soggetti sono stati sottoposti al test dell'espettorato indotto per la valutazione del BC ed è stata dimostrata un'associazione tra contenuto di PM nei macrofagi e leucociti ematici. Successivamente, lo stesso gruppo ha riscontrato un'associazione positiva tra la quantità di BC in soggetti non fumatori e i livelli plasmatici di LDL ossidate, suggerendo un effetto aterogeno del PM [98].

Infine Nwokoro e collaboratori [5], nel 2012 hanno confermato che alti livelli di esposizione anche a breve termine contribuiscono maggiormente al carico totale di BC nei macrofagi rispetto ad una esposizione continuativa ma bassa.

### **Monitoraggio della qualità dell'aria e valori limite.**

L'ARPA del Veneto (ARPAV) emette annualmente una relazione regionale della qualità dell'aria, riportando le analisi delle variazioni annuali della concentrazione degli inquinanti atmosferici dei 5 anni precedenti la pubblicazione [107]. La normativa di riferimento in materia di qualità dell'aria è costituita dal D.Lgs. 155/2010. Tale decreto non è altro che l'attuazione della direttiva 2008/50/CE "Relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa" e regola i livelli nell'aria ambientale di molti inquinanti, tra cui il biossido di zolfo (SO<sub>2</sub>), il biossido di azoto (NO<sub>2</sub>) e il particolato (PM<sub>10</sub> e PM<sub>2,5</sub>) [107]. L'ARPAV si avvale di una rete di 33 centraline per il monitoraggio delle concentrazioni di inquinanti ambientali. Le concentrazioni di inquinanti per ciascuna centralina, vengono rese pubbliche quotidianamente nel sito dell'ARPAV, dal quale è possibile anche accedere ai valori degli inquinanti pubblicati in passato.

### **Ruolo della distanza abitazione-strada principale**

Numerosi studi hanno valutato la distanza tra l'abitazione dei soggetti e la strada principale più vicina. La misura della distanza sembra essere correlata con i livelli sistemici di proteina C reattiva e IL-6 [108]. Vivere nei pressi di un'autostrada principale è inoltre associato a maggiore mortalità per malattia coronarica, infarto del miocardio [109] e mortalità post *stroke* ischemico [110]. Secondo un recente studio, le donne residenti entro 250 m da una strada principale hanno una probabilità maggiore di avere figli con basso peso alla nascita e parto pre o post-termine [111].

Nuvolone [112] e collaboratori hanno valutato in una coorte di 2062 soggetti, la distanza dalla strada principale alla loro abitazione e la funzionalità respiratoria. Sono stati individuati tre intervalli di distanza tra l'abitazione e la strada e per ciascuno di essi è stato associato un corrispondente livello di esposizione. Si sono considerati altamente esposti quei soggetti che abitavano entro 100 metri dalla strada principale, moderatamente esposti quelli tra 100 e 250 metri ed esposti in maniera trascurabile quelli tra 250 e 800 metri. Le misurazioni sono state effettuate tramite un Sistema Informatico di Geolocalizzazione (GIS). Lo studio ha evidenziato il potenziale effetto dell'inquinamento correlato al traffico sulla salute respiratoria, in quanto soggetti che abitavano più vicini alla strada principale avevano una peggiore salute respiratoria, e sottolinea l'utilità dei sistemi GIS nella ricerca sulla salute ambientale [112]. Ci sono evidenze che tale distanza correla anche con la prevalenza di BPCO, bronchite cronica e asma [113].

### **Valutazione del traffico veicolare nella provincia di Padova**

Per quanto concerne il territorio della provincia di Padova, i dati più completi e aggiornati sono forniti dal servizio provinciale di monitoraggio della viabilità, che emette periodicamente,

all'interno del "piano di viabilità della Provincia di Padova", i dati del traffico veicolare. Nella valutazione del 2012, i rilievi sono stati eseguiti dalla NET Engineering S.p.A per conto della provincia [114].

### **Esposizione occupazionale a particolato atmosferico**

Da un'analisi della letteratura le categorie più rappresentative di individui lavorativamente esposti al PM sono gli agenti di polizia stradale, i casellanti e i tassisti, esposti in particolare all'inquinamento veicolare, in quanto trascorrono gran parte della loro giornata lavorativa in mezzo al traffico, e i vigili del fuoco [103].

La maggior parte degli studi eseguiti sugli agenti di polizia riguardano gli effetti dell'inquinamento veicolare sulla morbilità respiratoria e valutano i valori ottenuti mediante spirometria ad esso correlati. In molte di essi appare evidente una diminuzione della funzione polmonare con una significativa riduzione del volume espiratorio forzato in 1 secondo (FEV1), nella capacità vitale forzata (FVC) e nella capacità vitale (VC), se comparati con soggetti che praticano mansioni non associate a esposizione a PM [104, 105]. Il calo della funzionalità polmonare ha mostrato una forte associazione con la durata del servizio nella polizia stradale, per cui gli anni lavorativi sono considerati forti predittori della funzione polmonare, in aggiunta all'età. I soggetti partecipanti presentavano sintomi respiratori come tosse, muco e riniti più consistenti, se comparati con quelli rilevabili nella popolazione generale. Il peggioramento della funzione polmonare sembrava essere associata anche al non utilizzo della mascherina tra gli agenti in servizio [61].

Fireman e collaboratori [103] hanno condotto uno studio sui vigili del fuoco che avevano lavorato la mattina del crollo del World Trade Center di New York, quindi esposti ad altissimi livelli di particolato e prodotti della combustione, contrapponendoli ai vigili del fuoco in servizio in Israele, scelti come gruppo di controllo. L'esposizione a PM di ciascun soggetto è stata indagata mediante un questionario. I risultati conseguiti hanno dimostrato come l'infiammazione e la distribuzione della misura del particolato erano differenti tra i vigili del fuoco di New York ed i controlli israeliani. Inoltre è stata evidenziata una significativa correlazione tra l'infiammazione locale, indicata dalla % di neutrofili ed eosinofili alla conta differenziale dell'espettorato indotto e l'esposizione cumulativa, misurata come carico delle particelle carboniose nei macrofagi [103].

Un altro gruppo di soggetti fortemente esposti ad elevati livelli ambientali di BC sono i ciclisti, ed in particolar modo i pendolari che per dirigersi a lavoro si spostano in bicicletta nelle grandi aree urbane. Uno studio ha coinvolto 48 individui sani residenti nella città di Londra ed ha previsto l'utilizzo della tecnica dell'espettorato indotto per rilevare tale esposizione. Lo studio ha dimostrato un aumento nella dose del BC inalato dai ciclisti durante il tragitto, che è risultato essere circa 2,6

volte superiore rispetto a quello inalato dai non ciclisti. Il contenuto di BC riscontrato nei macrofagi delle vie aeree dei ciclisti è apparso circa 1,6 volte più elevato se paragonato a quello dei non ciclisti, avvalorando l'ipotesi che il recarsi al lavoro in bicicletta possa essere associato ad un aumento a lungo termine della dose di BC inalata. Ciò suggerisce come l'entità e la distribuzione della ventilazione con l'esercizio fisico siano fattori determinanti il contenuto di BC macrofagico [5].

## **OBBIETTIVO**

È noto che l'esposizione all'inquinamento urbano possa favorire lo sviluppo e/o il peggioramento di malattie respiratorie e cardiovascolari. Tra gli inquinanti atmosferici, il particolato fine (PM10 e PM2,5) è quello maggiormente associato ad effetti avversi per la salute umana. È difficile stimare l'esposizione individuale a particolato aerodisperso partendo dai livelli di concentrazione nell'aria urbana a causa di molteplici confondenti come fonti indoor, abitudini voluttuarie (fumo) e diversità individuali (ventilazione, ostruzione bronchiale, ecc.). L'analisi delle particelle carboniose nei macrofagi delle vie aeree è un metodo per valutare l'accumulo di prodotti delle combustioni di combustibili fossili e biomasse nell'organo bersaglio. I fattori implicati in tale accumulo non sono ancora del tutto definiti; in particolare non è noto il ruolo del tabagismo e della presenza di patologia ostruttiva cronica delle vie aeree.

Lo studio si propone di indagare i determinanti dell'accumulo di particolato carbonioso nel citoplasma dei macrofagi delle vie aeree. Per fare ciò sono stati studiati soggetti con e senza abitudine al fumo e soggetti con e senza BPCO. Inoltre sono stati valutati i principali fattori confondenti, intrinseci od estrinseci, come l'inquinamento *outdoor* e *indoor*, il ruolo del traffico veicolare e la distanza con la strada principale, l'ostruzione bronchiale e l'infiammazione locale e sistemica.

## **MATERIALI E METODI**

### *Disegno dello studio*

Si sono confrontati 3 gruppi di soggetti residenti nella provincia di Padova: soggetti con diagnosi di BPCO, fumatori asintomatici con normale funzione respiratoria e soggetti sani, non fumatori. Nell'espettorato indotto di questi sono stati valutati il carico di carbone nei macrofagi e vari elementi, intrinseci ed estrinseci, ritenuti responsabili dell'accumulo di BC e considerati fattori confondenti: l'abitudine tabagica, l'esposizione a traffico, la funzione respiratoria e l'infiammazione sia sistemica che locale. I soggetti reclutati sono stati invitati a compilare un questionario per raccogliere informazioni circa la propria occupazione, tempo impiegato all'aria aperta, attività svolte all'aria aperta, esposizione a fumo di sigaretta, sistema di riscaldamento della casa, sistema di cottura dei cibi, altre sorgenti di fumo a casa e al lavoro.

# QUESTIONARIO

**CODICE Soggetto** |\_|\_|\_|\_|\_| Data Intervista: |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|

**Cognome** \_\_\_\_\_ **Nome** \_\_\_\_\_

Data di nascita |\_|\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|

Data di nascita del padre |\_|\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|

Data di nascita della madre |\_|\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|

Comune di nascita \_\_\_\_\_ Provincia |\_|\_|\_|

## Residenza

Via \_\_\_\_\_ n \_\_\_\_\_ CAP \_\_\_\_\_

Comune \_\_\_\_\_ Provincia |\_|\_|\_| Tel \_\_\_\_\_

Sesso:  M  F Altezza (cm) |\_|\_|\_|\_|\_| Peso (kg) |\_|\_|\_|\_|\_|

Circonferenza vita (cm) |\_|\_|\_|\_|\_|

## CONDIZIONI DI SALUTE

Infezioni respiratorie ultime tre mesi \_\_\_\_\_

Allergie \_\_\_\_\_

Farmaci \_\_\_\_\_

## Farmaci

Usa pomate, saponi, shampoo o altri preparati dermatologici al catrame?

SI  NO

Se SI, specificare \_\_\_\_\_

Negli ultimi 6 mesi ha assunto farmaci in modo regolare?

SI  NO

Se SI, può indicare quali farmaci, per che patologia e il dosaggio?

Farmaco	Patologia	Dose

Nella giornata di ieri ha assunto dei farmaci? SI  NO

se SI, elencare quali \_\_\_\_\_

Oggi ha assunto qualche farmaco? SI  NO

se SI, elencare quali \_\_\_\_\_

## **ESPOSIZIONE NELL'ABITAZIONE**

### **In quale zona abita?**

centro città     periferia     zona extra urbana/rurale

**La sua abitazione è vicina ad insediamenti industriali?**     SI     NO

se SI, quale tipo di industria? \_\_\_\_\_

**A che piano abita?** \_\_\_\_\_

**Il riscaldamento della sua abitazione è a**

legna     carbone     gasolio     gas

Centralizzato     Autonomo con termosifoni

Riscaldando con stufe se SI, indicare numero di stufe |\_\_|\_\_|\_\_|

**Altro tipo di riscaldamento:** descrivere \_\_\_\_\_

Ha il **caminetto** in casa?     SI     NO

se SI    indicare numero di caminetti |\_\_|\_\_|\_\_|

se SI,    nell'ultimo anno quante volte ha usato il caminetto sia per riscaldare che per cucinare?

Settimana    Mese    Anno    Mai  
|\_\_|\_\_|    o    |\_\_|\_\_|    o    |\_\_|\_\_|\_\_|    o   

### **Che tipo di combustibile ha usato?**

legna  carbonella  altro  se Altro, specificare: \_(candele) \_\_\_\_\_

Quando l'ha utilizzato l'ultima volta?    Data |\_\_|\_\_|/|\_\_|\_\_|/|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_| ora |\_\_|\_\_|.|\_\_|\_\_|

Ha **animali** in casa?     NO     SI, quali? \_\_\_\_\_

Quante volte **frigge** cibi: alla settimana |\_\_|\_\_| al mese |\_\_|\_\_| all'anno |\_\_|\_\_|

## **ESPOSIZIONE AMBIENTALE (EXTRAPROFESSIONALE)**

### Lavori a domicilio (hobbies)

con esposizione a oli minerali, catrame, fuliggine, fumi da combustione di legna, foglie o altro materiale combustibile, gas di scarico di motori. Indicare approssimativamente quante volte:

Alla settimana |\_\_|\_\_|    o    al mese |\_\_|\_\_|    o    all'anno |\_\_|\_\_|

Specificare il tipo di esposizione \_\_\_\_\_

### Mezzi di trasporto usati abitualmente

Autovettura	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tempo medio percorso al giorno .....
Tram	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tempo medio di attesa al giorno .....
Autobus urbano	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tempo medio di attesa al giorno .....
Autobus extra-urbano	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tempo medio di attesa al giorno .....
Bicicletta	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tempo medio percorso al giorno .....



Fumo passivo

21) Condividi abitualmente spazi/ambienti chiusi (es. ufficio, casa, bar, ecc.) con persone che fumano? SI  NO

22) Se SI, per quante ore al giorno circa? |\_\_|\_\_| ore

23) Se SI da quanti anni circa? |\_\_|\_\_| anni

**ESPOSIZIONE PROFESSIONALE**

Attuale professione: specificare \_\_\_\_\_

Per quale ditta lavora attualmente \_\_\_\_\_

Da quanto tempo lavora in questa ditta \_\_\_\_\_

Qual è la sua attuale mansione? \_\_\_\_\_

SEDE principale di lavoro:

Indirizzo VIA \_\_\_\_\_ N \_\_\_\_\_

Prov. \_\_\_\_\_ CAP \_\_\_\_\_

Da quanto tempo svolge la sua attuale mansione? \_\_\_\_\_

Ha svolto altri lavori nell'ultimo anno? (elencare con precisione)

SI  No Se SI, quali

Dal \_\_/\_\_/\_\_ Al \_\_/\_\_/\_\_:.....

**CONCLUSIONE**

INTERVISTATORE \_\_\_\_\_

Le caratteristiche cliniche, i profili cellulari dell'espettorato indotto e il conteggio di particelle di carbone nei macrofagi alveolari vengono confrontati tra soggetti affetti da BPCO, fumatori sani e controlli sani. È stato confrontato il conteggio di particelle in macrofagi polmonari con la valutazione dell'esposizione a inquinamento urbano effettuata con tre diversi metodi di campionamento ambientale. È stata analizzata l'influenza dell'inquinamento dell'aria e del fumo sul conteggio delle particelle di carbone nei macrofagi polmonari. Nella popolazione in esame si è verificato se possa esistere qualche associazione tra ostruzione delle vie aeree, infiammazione sistemica, infiammazione locale, fumo, inquinamento dell'aria e conteggio delle particelle di carbone nei macrofagi polmonari. Si sono studiate inoltre l'influenza del fumo, dell'inquinamento dell'aria, dell'infiammazione sistemica e dell'infiammazione locale sull'ostruzione delle vie aeree.

Criteri di esclusione: infezioni sistemiche e respiratorie nel mese antecedente il test dell'espettorato, assunzioni di antibiotici per via sistemica nel mese precedente l'espettorato.

### ***Soggetti***

I criteri di ammissibilità per tutti i soggetti erano: residenza in provincia di Padova e FEV1 superiore a 1L.

I soggetti affetti da BPCO inclusi nello studio sono stati selezionati in base ai seguenti criteri:

- Diagnosi di BPCO ( $VEMS/CVF < 70\%$ ) e  $VEMS < 80\%$  del teorico.
- Età compresa tra 40 e 85 anni.
- Anamnesi patologica negativa per asma bronchiale, allergie e atopia.
- Nessuna riacutizzazione di BPCO negli ultimi due mesi.
- Terapia non permessa: steroidi sistemici nel mese precedente alla raccolta dell'espettorato.

Tutti i soggetti hanno espresso il loro consenso informato alla partecipazione allo studio, che è stato condotto nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki, delle norme dell'Associazione Medica Mondiale e di "Good Clinical Practice" della Comunità Europea.

### ***Prove di funzionalità respiratoria***

Mediante uno spirometro saranno misurati il volume espiratorio massimo al primo secondo (FEV1), la FVC e la curva flusso/volume. Per ciascun soggetto saranno registrati i valori migliori di FEV1 e FVC dopo tre prove, che saranno confrontati con i valori teorici proposti dall'European Respiratory Society (ERS 93).

### ***Prelievo venoso***

Il sangue periferico, raccolto in appropriate provette per l'ottenimento del siero e del plasma, serve per l'analisi di markers di infiammazione sistemica e polmonare quali VES, PCR ad alta sensibilità. VES e PCR vengono misurate con una metodica a chemiluminescenza dal Laboratorio Centrale dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

### ***Espettorato indotto***

Ai soggetti è stato indotto l'espettorato come da procedura standard, ovvero, dopo averli istruiti della procedura, si è misurato il FEV1 pre-broncodilatatore ed è stato loro somministrato 200 mg di Salbutamolo per via inalatoria. Dopo 10 minuti viene rimisurato il FEV1 post broncodilatatore (Fig. 1A). Viene utilizzata una concentrazione di soluzione salina sterile al 3% per i primi 10 minuti e una al 4% per i successivi 10 minuti. Ogni 5 minuti si misura il FEV1 e si procede alla sospensione della nebulizzazione se il FEV1 misurato scende sotto il 20% del valore del FEV1 post broncodilatatore. Qualora invece si mantenga tra il 10-20% l'induzione procede per tutta la sua durata con nebulizzazione di soluzione salina al 3%. È stato chiesto al paziente di tossire e sputare al 5°, 10°, 15° e 20° minuto dell'induzione o quando sentisse il bisogno di tossire. L'espettorato è stato suddiviso in due aliquote.



**Figura 1 A.** Soggetto che esegue una spirometria.

**B.** Analisi dei frustoli al microscopio ottico.

Nella prima, i frustoli dell'espettorato sono stati selezionati dalla saliva (Fig.1B), mescolati meccanicamente con una pipetta e per dissolvere il muco gli è stato aggiunto un volume di ditiotritolo (DTT) 0.1% pari a quattro volte il peso del campione. Una volta diluito il campione con tampone fosfato (PBS), sarà filtrato attraverso una rete di nylon. Mediante esclusione di Trypan Blu è stata determinata la conta e la vitalità cellulare. La sospensione cellulare è stata centrifugata e il surnatante aliquotato e conservato a  $-80^{\circ}\text{C}$  per le successive analisi. Il pellet cellulare è stato

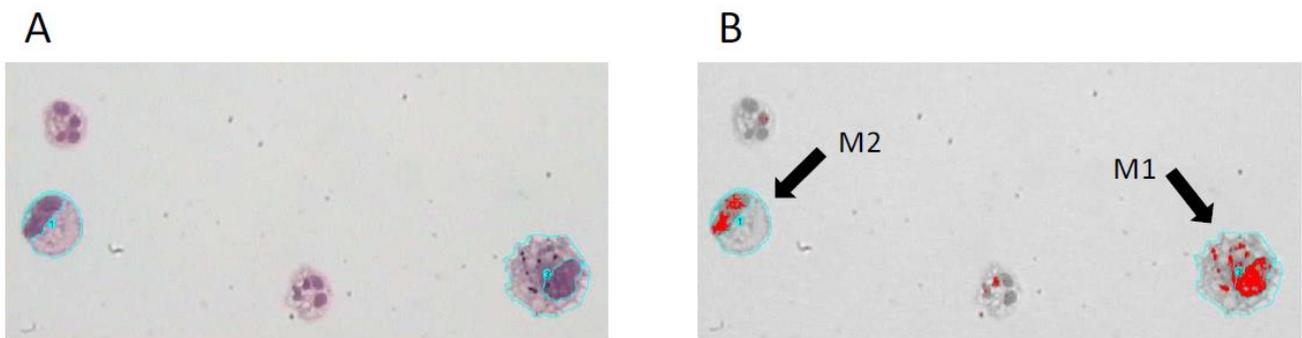
risospeso in PBS e citocentrifugato. I vetrini così ottenuti sono stati congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi.

Su due vetrini è stata eseguita la conta cellulare differenziale dei leucociti e delle cellule epiteliali squamose su vetrini colorati con Diff Quick. Per la conta differenziale dei leucociti sono state contate 400 cellule per vetrino utilizzando 2 vetrini per paziente. I risultati della conta differenziale sono stati espressi come percentuale di cellule nucleate.

### *Analisi del carbon load*

La conta delle particelle di carbone nei macrofagi polmonari è stata eseguita secondo il metodo proposto da Kulkarni et al. [96]: per ciascun soggetto da un vetrino di espettorato indotto colorato con Diff Quick sono stati fotografati 50 macrofagi scelti casualmente usando un microscopio ottico a ingrandimento 63X collegato ad una telecamera (Leica, Wetzlar, Germany). Le immagini sono state poi analizzate con il software ImageJ che ha consentito, dopo la creazione di una macro calibrata e la sua applicazione (Fig. 2A e 2B), di calcolare l'area occupata dalle particelle nere presenti nel citoplasma dei macrofagi. Un macrofago si definisce positivo per il BC se possiede al suo interno almeno una particella carboniosa. I risultati finali per ciascun paziente possono essere espressi come:

- percentuale di cellule con BC
- contenuto medio o mediano di BC per macrofago
- somma dell'area di tutte le particelle
- percentuale media o mediana dell'area delle particelle rispetto al citoplasma dei macrofagi



**Figura 2.**

Nell'immagine A ciascun citoplasma di macrofago viene circondato con il software Image J in azzurro e viene fatta "correre" una macro che riconosce l'area pigmentata di nero al suo interno. La figura B illustra le aree pigmentate di nero che vengono visualizzate in rosso dal programma. Escludendo il nucleo quindi, M1 è un macrofago positivo per il carico di carbone mentre M2 è un macrofago negativo.

Per effettuare un'accurata analisi dei dati dell'espettorato indotto, è stata valutata la variabilità operatore dipendente. Si sono confrontati i risultati dell'analisi delle particelle carboniose ottenuti da 2 operatori sugli stessi campioni di cellule (Tabella 6).

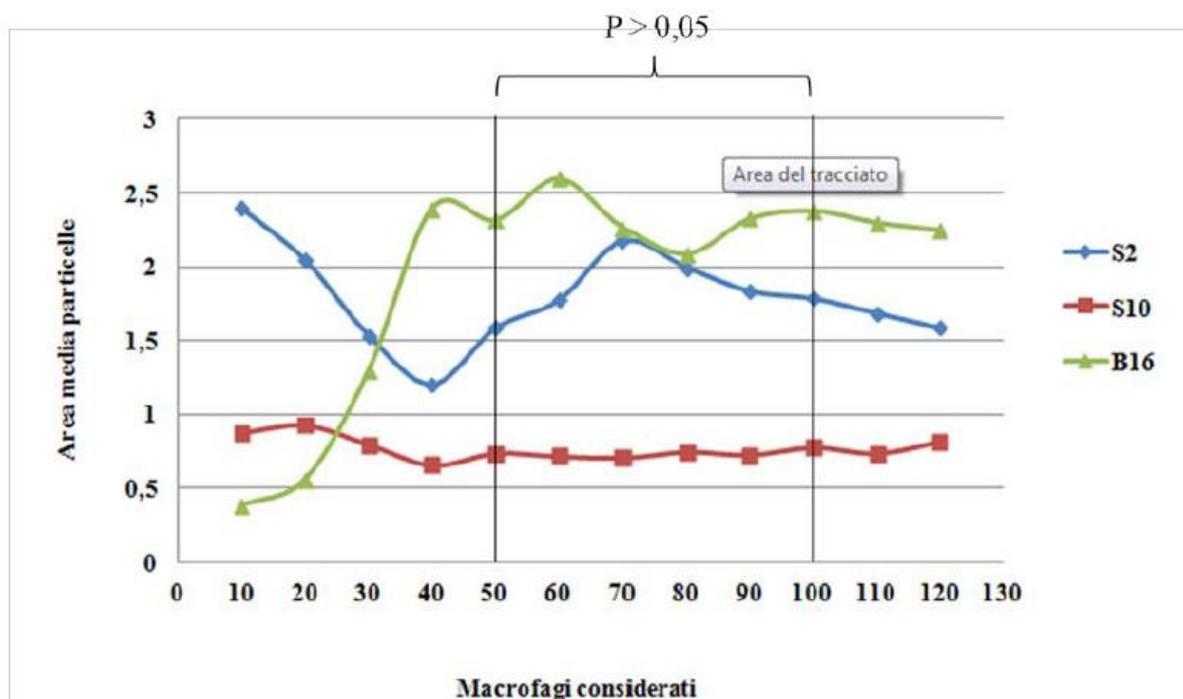
Campione	Operatore 1	Operatore 2	Mann Whitney test (p-value)
A	5,55	5,36	P > 0,9999
B	3,96	4,29	
C	4,41	4,37	
D	3,71	3,79	

**Tabella 6.** Valori medi dell'area occupata dal particolato ( $\mu\text{m}^2$ ) nei macrofagi di 4 campioni appartenenti a 4 diversi soggetti valutati da 2 operatori indipendenti.

Le misure di area media occupata dal particolato effettuate in cieco da 2 operatori indipendenti non sono risultate significativamente diverse.

Poiché in letteratura alcuni studi sulle particelle carboniose nei macrofagi alveolari analizzavano 50 macrofagi ed altri 100, e avendo i BPCO nei campioni di espettorato una bassa percentuale di macrofagi, si è reso necessario verificare se l'analisi di 50 macrofagi potesse inficiare il valore reale di particelle nei macrofagi.

E' stata quindi valutata l'area media del contenuto di particolato ( $\mu\text{m}^2$ ) considerando un numero crescente di macrofagi in 3 diversi soggetti (Figura 3).



**Figura 3.** Area media del contenuto di particolato ( $\mu\text{m}^2$ ) per conta cellulare crescente in 3 diversi soggetti fino a 120 cellule. S2, S10 e B16 corrispondono ai codici assegnati ai 3 soggetti in analisi.

Si osserva che a partire dalle conte di circa 50 macrofagi il valore di area medi delle particelle si stabilizza. Confrontando l'area media delle particelle carboniose in 50 e 100 cellule, l'assenza di significatività statistica conferma che la valutazione di 50 cellule è sufficiente a stimare il valore reale di BC macrofagico ( $p > 0,05$ ).

### ***Esposizione a traffico.***

Si è deciso di arruolare solo soggetti residenti in provincia di Padova poiché questi rappresentano la maggioranza dei soggetti afferenti al servizio di Fisiopatologia Respiratoria dell'Azienda Ospedaliera di Padova. I dati impiegati per studiare l'esposizione a inquinamento urbano provenienti da centraline o da misure della densità del traffico sono stati raccolti secondo le stesse modalità e gli stessi strumenti per tutti i soggetti residenti in questa provincia. Inoltre, si è assunto che il flusso di traffico associato alla strada principale più vicina all'abitazione dei soggetti fosse costante nel tempo.

L'esposizione a traffico è stata valuta con tre diversi parametri:

- I) campionamento di PM<sub>10</sub>, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub> nell'aria
- II) misura della distanza dell'abitazione dalla strada principale
- III) flusso di traffico nella strada più vicina all'abitazione.

#### *I) Campionamento PM<sub>10</sub>, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>*

Le concentrazioni urbane di PM<sub>10</sub>, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub> nell'aria sono state ricavate da due campionatori fissi dell'agenzia locale per l'Ambiente (ARPAV) disponibili nella città di Padova, localizzati rispettivamente in zona Arcella (zona di traffico urbano, TU), e in zona Mandria (zona definita di background urbano, BU). La metodologia delle misurazioni in siti fissi prevede la determinazione dei livelli di concentrazione degli inquinanti atmosferici mediante rilevamento in centraline automatiche dislocate in punti fissi del territorio. Il monitoraggio del materiale particolato inferiore a 10 µm (PM<sub>10</sub>) e a 2,5 µm (PM<sub>2,5</sub>) degli ossidi di azoto (NO e NO<sub>2</sub>) e di biossido di zolfo (SO<sub>2</sub>) viene realizzato mediante l'impiego di strumentazione automatica o manuale contenuta nelle centraline. Il campionamento dell'aria ambiente avviene con frequenza oraria o giornaliera e ciascuno strumento determina la concentrazione dell'inquinante in base al caratteristico principio chimico-fisico di funzionamento. I dati prodotti da ciascuno strumento sono raccolti e archiviati da un computer (*datalogger*) presente in ciascuna centralina; il *datalogger* trasmette i dati ai centri operativi provinciali dove viene eseguita l'operazione di verifica dei dati (validazione) e l'immissione degli stessi nella tabella della qualità dell'aria presente nel sito internet. In base al

luogo di residenza dei soggetti e alla data della visita sono stati raccolti in un apposito database i dati relativi alla loro esposizione nell'anno precedente la loro visita.

*II) Valutazione della distanza tra l'abitazione e la strada principale.*

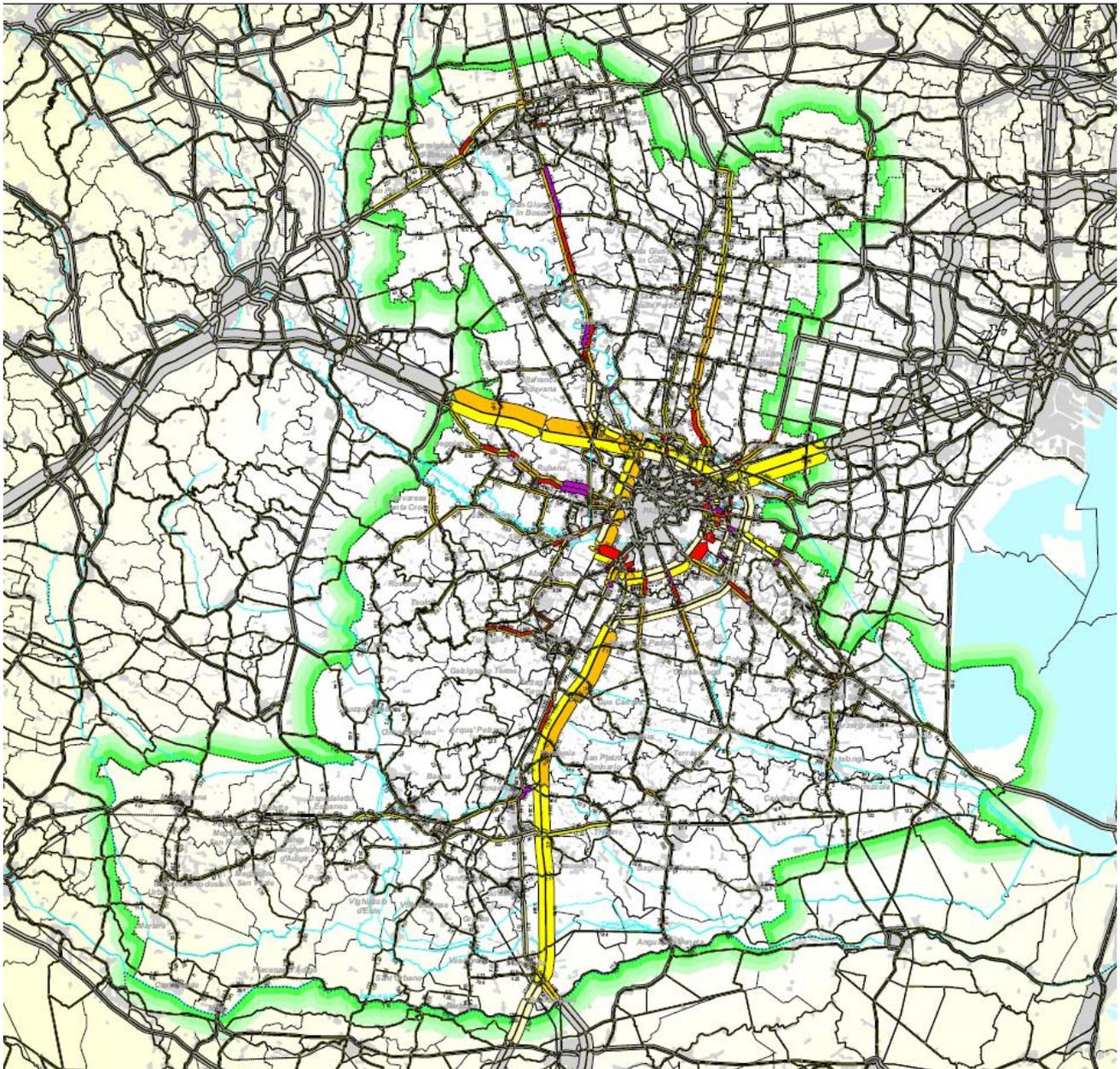
Per valutare l'esposizione a inquinamento da traffico è stata utilizzata la distanza dell'abitazione di ciascun soggetto dalla strada principale calcolata con lo strumento di misurazione delle distanze di GoogleMap. I campioni sono stati classificati in tre gruppi (Tab. 7). Questi valori di cut-off sono stati selezionati sulla base dei risultati di precedenti studi che dimostrano un aumento dell'esposizione e del rischio di sintomi respiratori entro brevi distanze dalle strade più trafficate [109-113].

<b>Distanza dalla strada principale (m)</b>	<b>Esposizione</b>
0-50	Elevata
51-250	Moderata
>250	Trascurabile

**Tabella 7.** Suddivisione in tre livelli di esposizione in base alla distanza della loro residenza dei soggetti dalla strada principale (m).

*III) Flusso di traffico*

Come indice del flusso di traffico della strada principale più vicina all'abitazione dei soggetti è stato utilizzato il numero di veicoli equivalenti dell'ora di punta del mattino. I dati sono stati ricavati dal Piano Provinciale della Viabilità pubblicato online [114]. Effettuato nel 2012, questo piano è stato il frutto di una campagna di indagini di traffico sulla rete stradale della Provincia di Padova. I rilievi sono stati eseguiti utilizzando apparecchiature di tipo piastre Nu-Metrics NC-97 e Radar Easy Data. Le rilevazioni sono state tutte effettuate nel mese di maggio 2010 e ciascuna strada è stata monitorata per un periodo di 40 ore nelle giornate centrali della settimana (solitamente mercoledì e giovedì). I veicoli merci sono stati resi equivalenti alle autovetture attraverso coefficienti standard (pari a 1,5 , 2 o 2,5 a seconda della lunghezza del mezzo pesante) che tengono conto dell'ingombro dei veicoli merci e degli ostacoli che essi generano al deflusso dei veicoli; i risultati di flusso di traffico quindi sono stati espressi in veicoli equivalenti. Sono stati calcolati i valori medi dell'ora di punta del mattino dalle 7.30 alle 8.30 e mappati sul territorio. Nella Figura 4 si riporta il flussogramma (che riproduce i flussi che caricano la rete infrastrutturale) da cui è stato possibile determinare il flusso di traffico della strada più vicina all'abitazione per ciascun soggetto (Fig.5).



**Legenda:**

- 
 Flusso orario in unità veicolari equivalenti  
 Ora di punta del mattino 7.30 ÷ 8.30
- 
 Centri urbani
- 
 Confini comunali
- 
 Confini provinciali

**Figura 4.** Flussi di traffico della provincia di Padova.

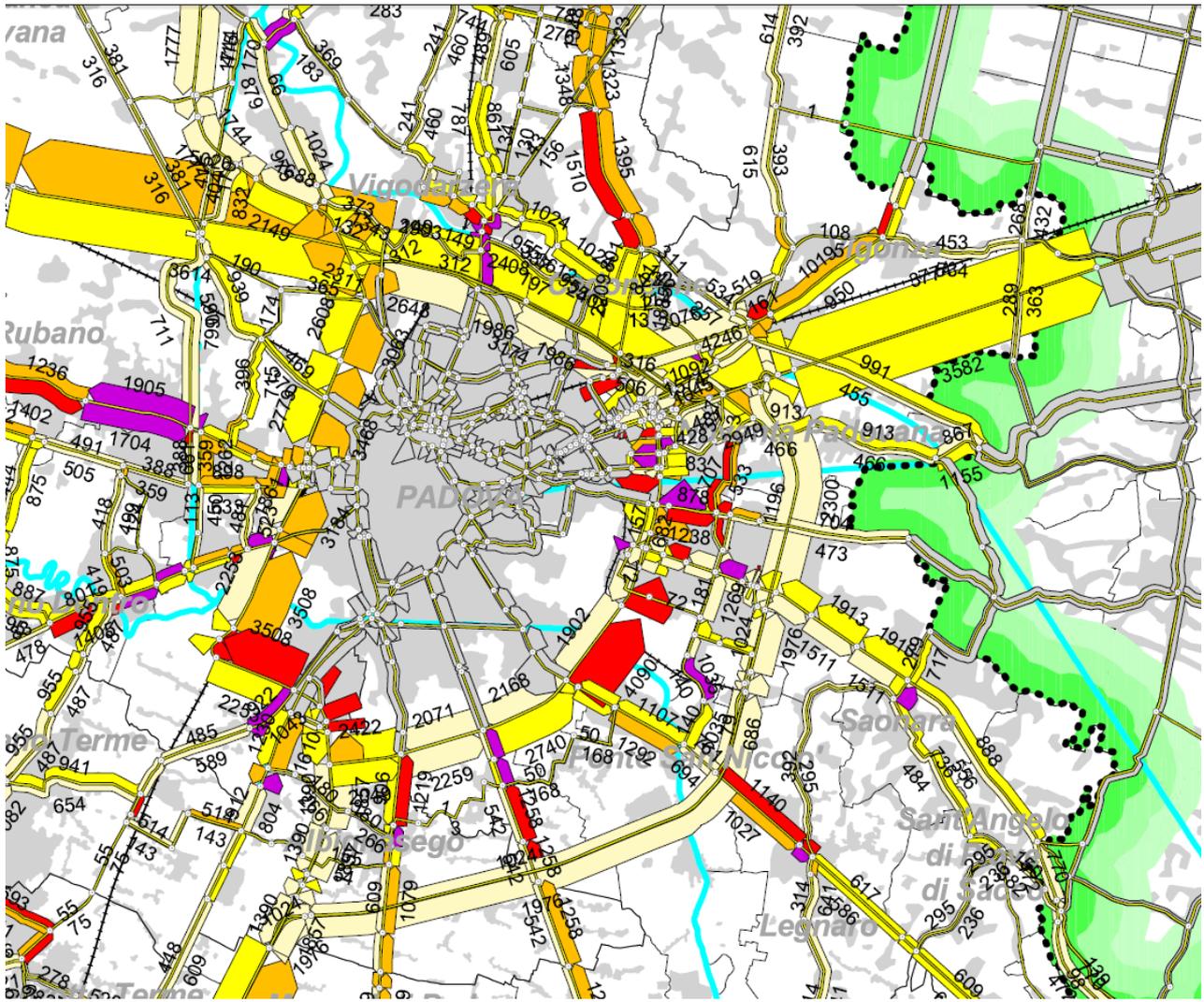


Figura 5. Ingrandimento dei flussi di traffico dell'area di Padova.

### *Analisi statistica*

Tutti i casi saranno codificati e l'analisi di tutti i campioni sarà condotta senza essere a conoscenza dei dati clinici e funzionali dei soggetti a cui appartengono. Tutti i risultati saranno raccolti in uno più database e le differenze tra i gruppi di soggetti esaminati saranno valutate utilizzando test statistici parametrici (per le caratteristiche cliniche) e non parametrici (per le caratteristiche morfometriche). Verranno impiegati i software statistici Satview, Statgraphic, Minitab, R e NPC test.

## RISULTATI

Sono stati reclutati 20 pazienti affetti da BPCO, 19 fumatori senza limitazione al flusso aereo e 19 non fumatori. Tuttavia non tutti sono stati in grado di produrre un campione di espettorato: il tasso di successo è stato dell'80%, del 74% e del 63% rispettivamente per i soggetti con BPCO, per i fumatori e per i non fumatori sani. Mentre i fumatori (sia malati che non) producono più muco, ai soggetti non fumatori sani è richiesta una maggiore collaborazione e comunque, in più di un terzo dei casi, quando producono il campione questo si rivela essere insufficiente (<40 mg) o non idoneo (prevalenza di saliva). Nelle tabelle 8, 9 e 10 vengono confrontati i soggetti che non hanno espettorato, quindi esclusi dalle successive analisi, con soggetti che hanno espettorato.

	<b>BPCO esclusi</b>	<b>BPCO inclusi</b>	<i>Mann-Whitney test: p-value</i>
<b>Sesso</b>	4M 2F	12M 2F	-
<b>Età (anni)</b>	69 ± 3	70 ± 2	1.00
<b>BMI</b>	29 ± 1	26 ± 1	0.21
<b>FEV1/FVC POST BD (%)</b>	71 ± 6	56 ± 2	0.06
<b>FEV1 POST BD (%)</b>	69 ± 9	66 ± 5	0.19
<b>KCO</b>	58 ± 11	52 ± 5	0.22
<b>Pack years (n°)</b>	16 ± 10	50 ± 5	0.01

**Tabella 8.** Confronto tra i soggetti con BPCO esclusi e quelli inclusi nello studio. I dati sono espressi come media ± errore standard.

	<b>Fumatori esclusi</b>	<b>Fumatori inclusi</b>	<b>Mann-Whitney test: p-value</b>
<b>Sesso</b>	5M 0F	7M 7F	-
<b>Età (anni)</b>	53 ± 5	60 ± 2	0.11
<b>BMI</b>	27 ± 1	26 ± 1	0.59
<b>FEV1/FVC POST BD (%)</b>	100 ± 2	79 ± 1	<0.01
<b>FEV1 POST BD (%)</b>	99 ± 4	111 ± 5	0.38
<b>KCO</b>	63 ± 7	70 ± 6	0.71
<b>Pack years (n°)</b>	18 ± 9	35 ± 6	0.18

**Tabella 9.** Confronto tra i soggetti fumatori esclusi e quelli inclusi nello studio. I dati sono espressi come media ± errore standard.

	<b>Non fumatori esclusi</b>	<b>Non fumatori inclusi</b>	<b>Mann-Whitney test: p-value</b>
<b>Sesso</b>	4M 3F	6M 6F	-
<b>Età (anni)</b>	60 ± 3	58 ± 3	0.73
<b>BMI</b>	29 ± 1	26 ± 1	0.37
<b>FEV1/FVC POST BD (%)</b>	104 ± 1	91 ± 3	0.03
<b>FEV1 POST BD (%)</b>	100 ± 4	112 ± 4	0.14
<b>KCO</b>	92 ± 12	82 ± 5	0.39

**Tabella 10.** Confronto tra i soggetti non fumatori sani esclusi e quelli inclusi nello studio. I dati sono espressi come media ± errore standard.

Si osserva che in tutti e tre i gruppi di soggetti gli esclusi avevano il FEV1/FVC (%) dopo broncodilatatore significativamente maggiore rispetto agli inclusi. Inoltre i soggetti con BPCO esclusi si differenziano significativamente dagli inclusi per un minore pack-years. Per gli altri parametri quali età, BMI, FEV1 (%) dopo broncodilatatore e KCO invece non vi sono differenze statisticamente significative.

	<b>BPCO</b>	<b>Fumatori</b>	<b>Non fumatori</b>
<b>Sesso</b>	12M 2F	7M 7F	6M 6F
<b>Età</b>	70 ± 2 * ▲	60 ± 2	58 ± 3
<b>BMI</b>	26 ± 1	26 ± 1	26 ± 1
<b>FEV1/FVC% POST BD</b>	56 ± 2 * ▲	79 ± 1 ▲	91 ± 3
<b>FEV1% POST BD</b>	66 ± 5 * ▲	111 ± 5	112 ± 4
<b>KCO</b>	52 ± 5 ▲	70 ± 6	82 ± 5

**Tabella 11.** Caratteristiche cliniche dei soggetti che hanno prodotto un campione di espettorato idoneo. I dati sono espressi come media ± errore standard. \* p<0.01 vs fumatori ▲p<0.01 vs non fumatori.

Tra i soggetti inclusi nello studio (Tab. 11) quelli affetti da BPCO sono statisticamente più anziani dei fumatori e non fumatori ( $p < 0.01$ ). I BPCO hanno valori di FEV1 (%) e FEV1/FVC (%) dopo broncodilatatore significativamente ridotti rispetto ai soggetti fumatori e sani ( $p < 0.01$ ), come previsto dal sistema di classificazione delle linee guida internazionali [11]. I BPCO presentano anche una KCO significativamente inferiore rispetto ai non fumatori sani ( $p < 0.01$ ).

Per ogni campione di espettorato indotto è stata valutata la vitalità e la conta cellulare differenziale. Dai dati ottenuti emerge che sono stati selezionati e analizzati quantità di espettorato indotto equiparabili nei tre gruppi di soggetti e che non possedevano diversa vitalità cellulare (Tab. 12).

	<b>BPCO</b>	<b>FUMATORI</b>	<b>NON FUMATORI</b>	<b>Kruskal-Wallis test: p-value</b>
<b>CONTA CELL TOT (10<sup>6</sup> cellule)</b>	11.6 (13.1)	5.6 (8.1)	7.8 (7.7)	0.274
<b>VITALITA CELL (%)</b>	58.5 (21.5)	62.7 (20.4)	63.1 (24.0)	0.754

**Tabella 12.** Conta cellulare totale e vitalità cellulare delle cellule dell'espettorato indotto per ciascun gruppo di soggetti. I dati sono espressi come mediana (Range Interquartile).

Per ogni campione sono stati colorati due vetrini cytopspin con il Diff Quik al fine di effettuare la conta differenziale delle cellule: i risultati ottenuti per ciascun gruppo di soggetti sono stati espressi in cellule/mg (Tab. 13) e in percentuale normalizzata per il numero di squamose (Tab. 14)

Cell/mg	BPCO	Fumatori	Non fumatori
<b>Macrofagi</b>	0.71 ± 0.26	1.05 ± 0.36	0.69 ± 0.26
<b>Neutrofili</b>	2.59 ± 0.93* <sup>▲</sup>	0.84 ± 0.28	0.67 ± 0.14
<b>Eosinofili</b>	0.195 ± 0.139* <sup>▲</sup>	0.011 ± 0.006	0.002 ± 0.001
<b>Linfociti</b>	0.078 ± 0.025* <sup>▲</sup>	0.018 ± 0.005	0.022 ± 0.011
<b>Bronchiali</b>	0.012 ± 0.006	0.010 ± 0.005	0
<b>Squamose</b>	0.091 ± 0.034 <sup>▲</sup>	0.075 ± 0.031 <sup>▲</sup>	0.010 ± 0.006

**Tabella 13.** Conta differenziale in cellule/mg delle cellule dell'espettorato indotto per ciascun gruppo di soggetti. I dati sono espressi come media ± errore standard. \* p<0.01 vs fumatori  
<sup>▲</sup>p<0.01 vs non fumatori.

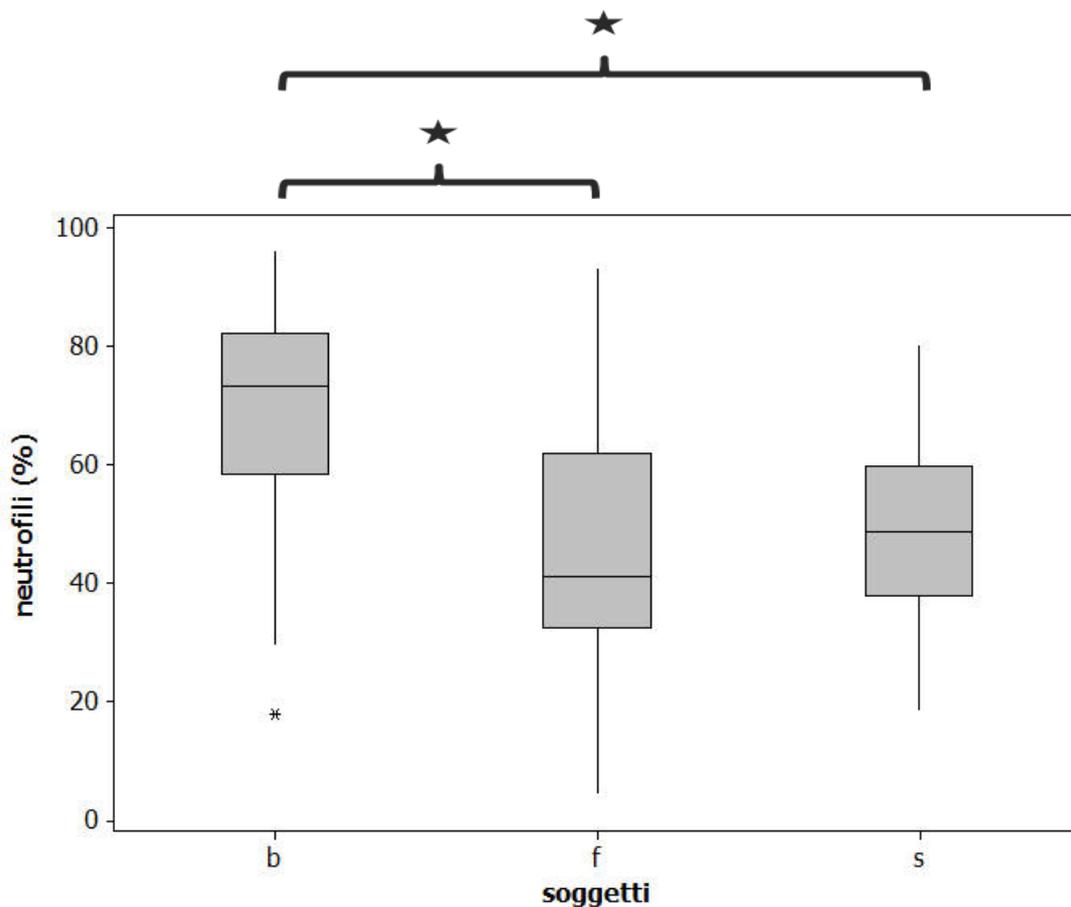
CELLULE (%)	BPCO	Fumatori	Non fumatori
<b>Macrofagi</b>	20.6 ± 3.9 * <sup>▲</sup>	47.9 ± 5.7	52.1 ± 5.1
<b>Neutrofili</b>	69.7 ± 5.5 * <sup>▲</sup>	47.5 ± 6.4	46.0 ± 5.3
<b>Eosinofili</b>	5.8 ± 3.7 * <sup>▲</sup>	0.6 ± 0.2	0.3 ± 0.1
<b>Linfociti</b>	2.4 ± 0.4 * <sup>▲</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>▲</sup>	1.2 ± 0.3
<b>Bronchiali</b>	1.4 ± 0.9	0.9 ± 0.5	0.4 ± 0.3
<b>Squamose</b>	5.6 ± 2.5	5.8 ± 2.6	0.9 ± 0.5

**Tabella 14.** Conta differenziale in percentuale delle cellule dell'espettorato indotto per ciascun gruppo di soggetti. I dati sono espressi come media ± errore standard. \* p<0.01 vs fumatori  
<sup>▲</sup>p<0.01 vs non fumatori.

Nei soggetti con BPCO si osserva una diminuzione nella percentuale dei macrofagi, mentre aumentano in percentuale i granulociti (neutrofili e eosinofili).

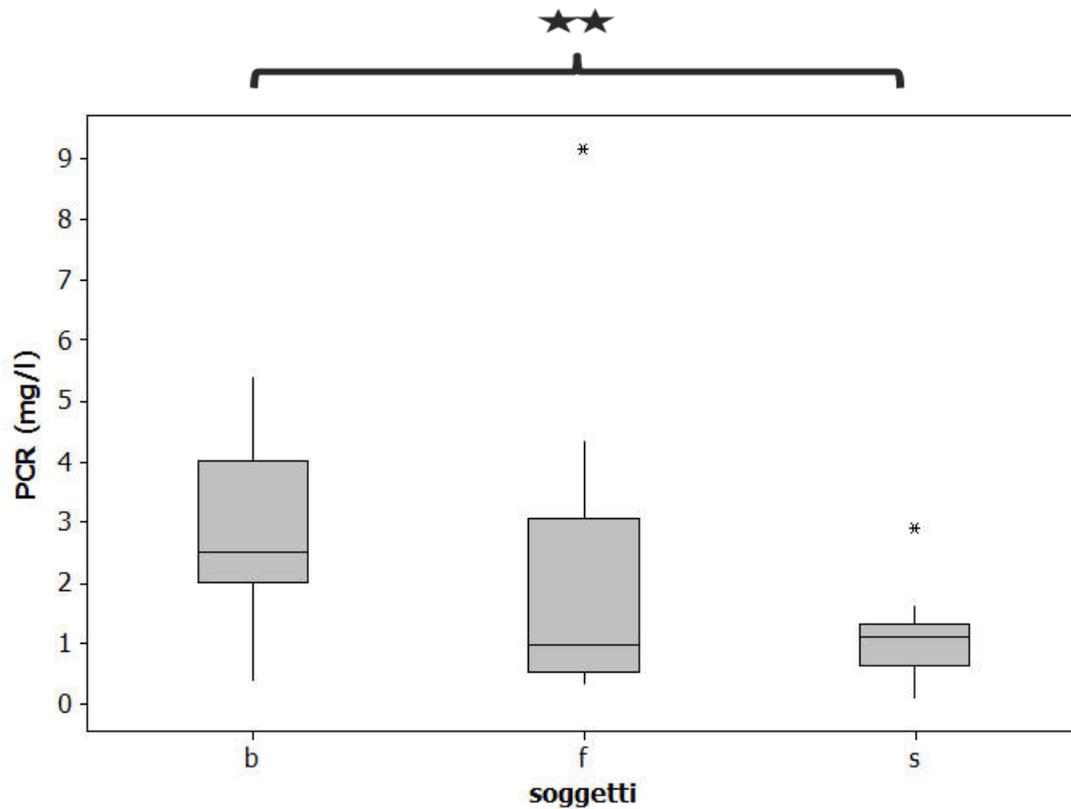
La percentuale di cellule squamose inferiore al 20% indica che i campioni nei tre gruppi di soggetti sono idonei, i frustoli sono stati ben selezionati e i campioni sono stati contaminati da cellule di origine orale solo limitatamente.

L'infiammazione locale, valutata con la misura della percentuale di neutrofili presente nell'espettorato indotto, è risultata più elevata nei BPCO (mediana: 73.2, [range interquartile: 58.5-82.1]) rispetto ai fumatori (42.2, [31.9-62.1] p<0.05) e non fumatori sani (48.6, [37.9-59.8], p<0.05) (Fig 6).



**Figura 6.** Grafico a scatola e baffi riguardante la percentuale di neutrofilii nell'espettorato indotto per ogni gruppo di soggetti (b: BPCO; f: fumatori; s: non fumatori sani). È marcata la mediana per ciascun gruppo e i baffi rappresentano l'intervallo in cui si distribuiscono i dati, \* indica i valori outliers, ★ indica  $p < 0.05$ .

La misura della concentrazione della PCR ad elevata sensibilità nel sangue, indice di infiammazione sistemica, è significativamente aumentata nei soggetti con BPCO rispetto ai non fumatori sani (1.1, [0.6-1.3],  $p < 0.01$ ). Non vi sono differenze statisticamente significative invece tra BPCO e fumatori, così come tra fumatori e non fumatori sani (Fig. 7).

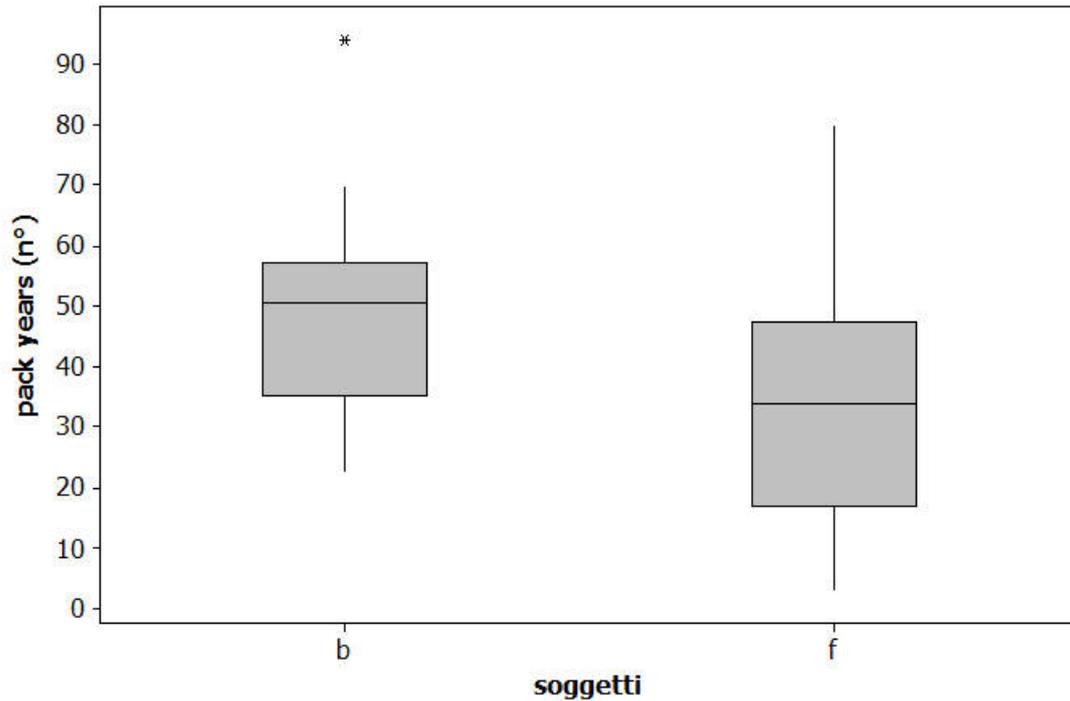


**Figura 7.** Grafico a scatola e baffi della misura della concentrazione della PCR nel sangue (mg/L) per ogni gruppo di soggetti (b: BPCO; f: fumatori; s: non fumatori sani). Viene marcata la mediana per ciascun gruppo e i baffi rappresentano l'intervallo in cui si distribuiscono i dati, \* indica i valori outliers, ★ ★ indica  $p < 0.01$ .

La storia di fumo è stata raccolta grazie al questionario ed è stata espressa in pack-years, dove:

$$\text{Pack-years} = (\text{n}^\circ \text{ di sigarette fumate al giorno} \times \text{n}^\circ \text{ di anni che il soggetto ha fumato}) / 20$$

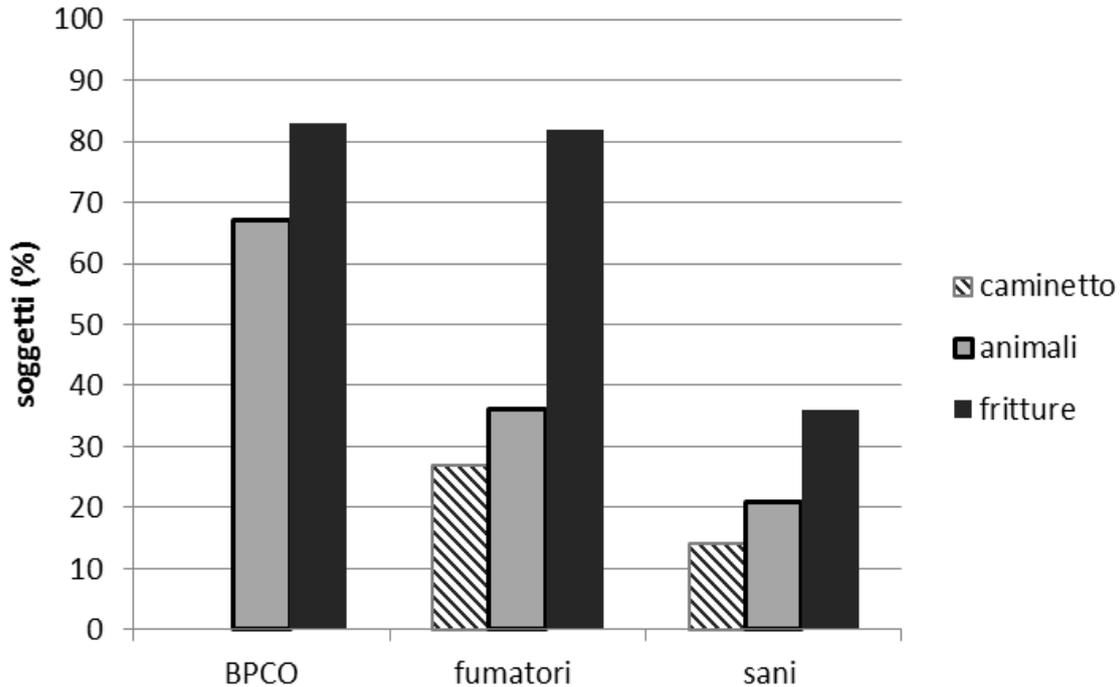
Si è potuto quindi osservare che il pack-years tra i soggetti con BPCO e i fumatori sani non era significativamente diverso (Fig 8).



**Figura 8.** Grafico a scatola e baffi del numero di pacchetti di sigarette fumati all'anno per il gruppo di soggetti con BPCO (b) e fumatori (f). Viene marcata la mediana per ciascun gruppo e i baffi rappresentano l'intervallo in cui si distribuiscono i dati. \* indica i valori outliers.

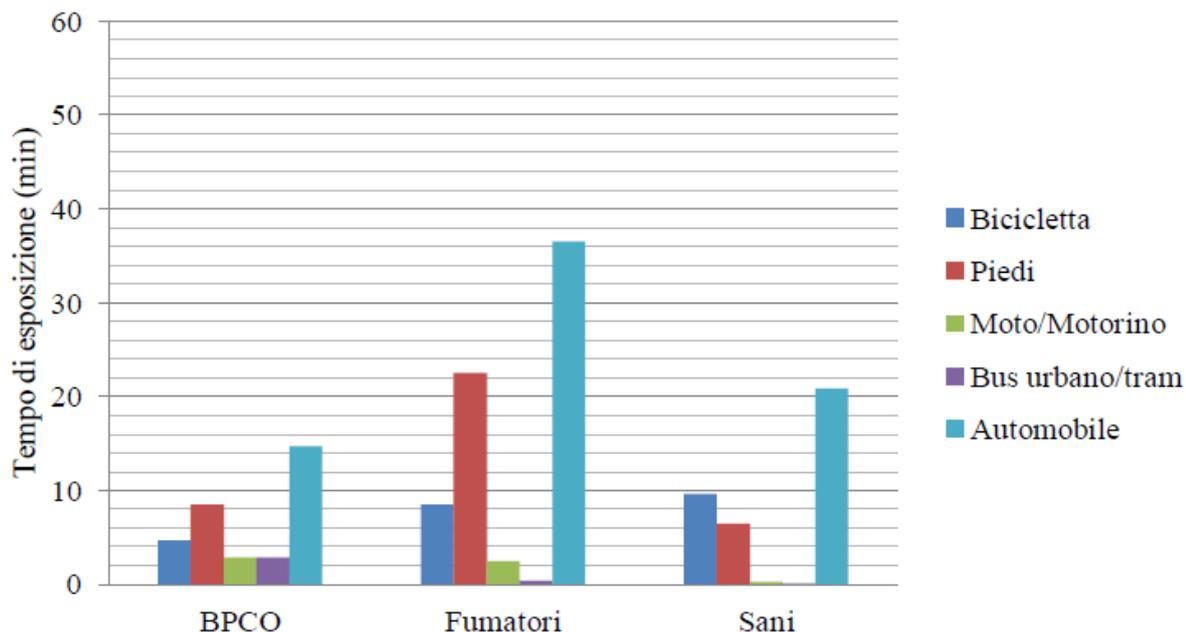
Tutti i soggetti reclutati sono stati invitati a compilare il questionario per raccogliere informazioni circa l'esposizione a fumo passivo di sigaretta, a inquinamento *indoor*, a inquinamento dell'aria negli spostamenti quotidiani e all'esposizione professionale, in quanto tutti questi fattori potrebbero rappresentare dei confondenti importanti nella valutazione finale dell'esposizione soggettiva a PM.

I soggetti esposti a fumo passivo erano equamente distribuiti tra i tre gruppi (2 BPCO, 2 fumatori e 2 non fumatori sani).



**Figura 9:** Fonti di inquinamento *indoor* dei soggetti inclusi per ciascun gruppo: BPCO, fumatori e sani. I valori sono espressi in percentuale.

Per quanto riguarda l'esposizione all'inquinamento *indoor* si sono confrontati i dati relativi all'uso del caminetto, agli animali presenti in casa e le fritturae effettuate nei tre gruppi (Figura 9). Al test del Chi Quadro, non si evidenzia una differenza statisticamente significativa nel confronto tra i tre gruppi, tuttavia i soggetti sani hanno uno stile di vita più salutare essendo meno esposti a fumi da caminetto, peli di animali domestici e fumi da fritturae. Nello studiare l'esposizione a inquinamento dell'aria è stato registrato il tempo medio riferito per gli spostamenti quotidiani nei 3 gruppi di soggetti (Figura 10). Nella valutazione dell'esposizione a inquinanti durante l'utilizzo di mezzi di trasporto, per gli spostamenti in bicicletta, a piedi, in moto e in auto, è stato considerato il tempo medio trascorso in viaggio, mentre per il bus e il tram è stato considerato il tempo medio di attesa prima di salire a bordo del mezzo. Tale criterio si giustifica ritenendo verosimile che la maggiore esposizione a inquinanti dovuta a questi mezzi si debba verificare durante l'attesa alla fermata o stazione.



**Figura 10.** Tempo medio (min) di esposizione dei soggetti BPCO, fumatori e sani per gli spostamenti quotidiani secondo i vari mezzi.

Dai questionari è emerso che la maggior parte dei soggetti usa l'automobile, mentre l'utilizzo di ciclomotori e trasporti pubblici è poco frequente. Non si è riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa (test Kruskal-Wallis) nei tre gruppi di soggetti per ciascun mezzo di trasporto.

Per quanto riguarda l'esposizione occupazionale, tra i soggetti con BPCO, 5 hanno riferito una storia lavorativa di esposizione a particolato o inquinanti dell'aria, più precisamente: 2 come operai metalmeccanici, un agricoltore, uno scavatorista e un panettiere. Tra i fumatori un solo soggetto ha lavorato come aiuto cuoco e quindi poteva avere una storia di esposizione a fumi o particolato da farine. Tra i sani, i soggetti potenzialmente esposti a fumi o particolato da polveri erano solo 2: un commerciante ambulante e un operaio. Non è stata analizzata l'esposizione professionale tra i vari gruppi per la bassa numerosità dei soggetti.

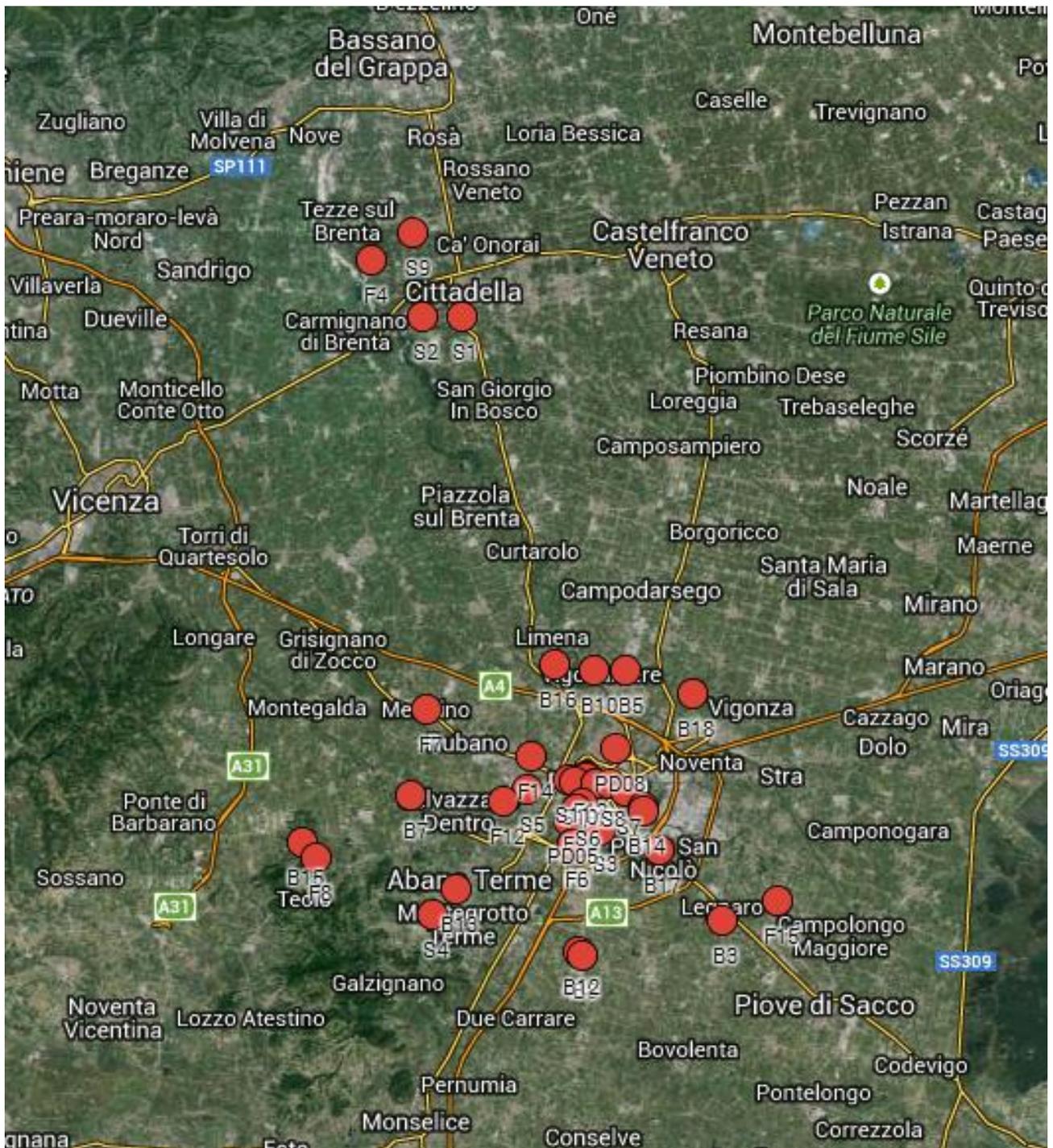
### *Esposizione a traffico*

L'esposizione individuale agli inquinanti (PM10, NO2 e SO2) nell'anno precedente la raccolta dell'espettorato, determinata utilizzando i dati ambientali forniti dall'ARPAV, non è risultata essere significativamente diversa tra i tre gruppi (Tab. 15).

<b>INQUINANTE (<math>\mu\text{g}/\text{m}^3</math>)</b>	<b>BPCO</b>	<b>FUMATORI</b>	<b>NON FUMATORI</b>	<i>Kruskal-Wallis test: p-value</i>
<b>PM10</b>	43.5 (3.0)	42.0 (3.0)	42 (0)	0.182
<b>NO2</b>	49.0 (8.0)	48.0 (4.0)	48.0 (6.0)	0.287
<b>SO2</b>	1.4 (0.7)	1.4 (0.1)	1.5 (0.2)	0.710

**Tabella 15.** Mediana (Range Interquartile) delle concentrazioni ambientali di PM10, NO2 e SO3 rilevate dalle centraline dell'ARPAV per ciascun gruppo di soggetti.

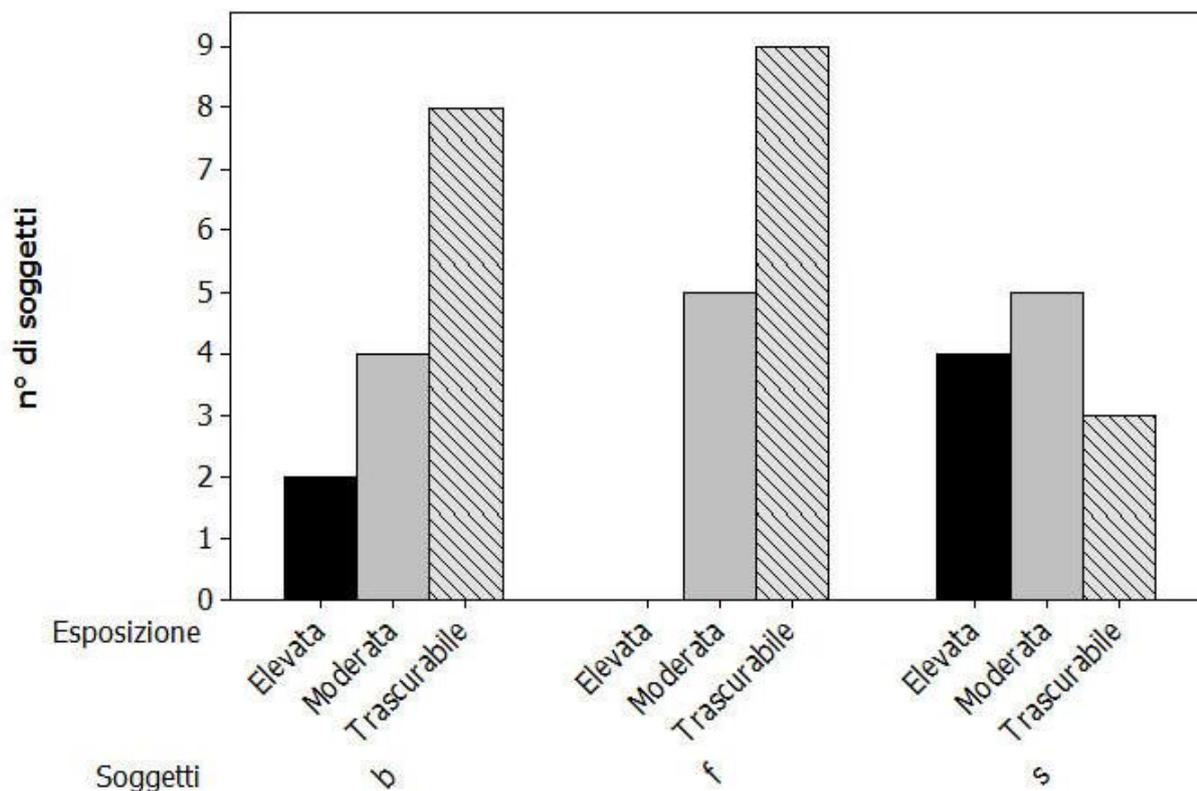
Al fine di indagare più approfonditamente l'esposizione a traffico urbano, come riportato da altri autori in letteratura [110], si è considerata la distanza dell'abitazione dalla strada principale quale indice di esposizione a traffico. Innanzitutto la residenza di ciascun soggetto è stata mappata sul territorio della provincia di Padova (Fig. 11).



**Figura 11.** Mappa satellitare della provincia di Padova in cui ogni bollino individua la residenza di ciascun soggetto codificato (B: BPCO, F: fumatore, S: non fumatore sano).

Tutti i soggetti sono stati raggruppati in 3 classi in base alla distanza della loro abitazione dalla strada principale (Tab. 7). Il 50% di tutti i soggetti risiede entro 250 m dalla strada principale e quindi è esposto a traffico urbano. Considerando tutti i soggetti, la distanza media dalla strada principale era 345.8 m.

Osservando il grafico in figura 16 si può notare che la maggioranza dei BPCO (8/14) e dei fumatori (9/12) risiede ad una distanza maggiore di 250 m dalla strada principale per cui l'esposizione a traffico è da considerarsi trascurabile. La maggioranza dei soggetti sani non fumatori (9/12) invece sono esposti a traffico urbano.



	BPCO	FUMATORI	SANI
<b>Elevata</b>	2	0	4
<b>Moderata</b>	4	5	5
<b>Trascurabile</b>	8	9	3

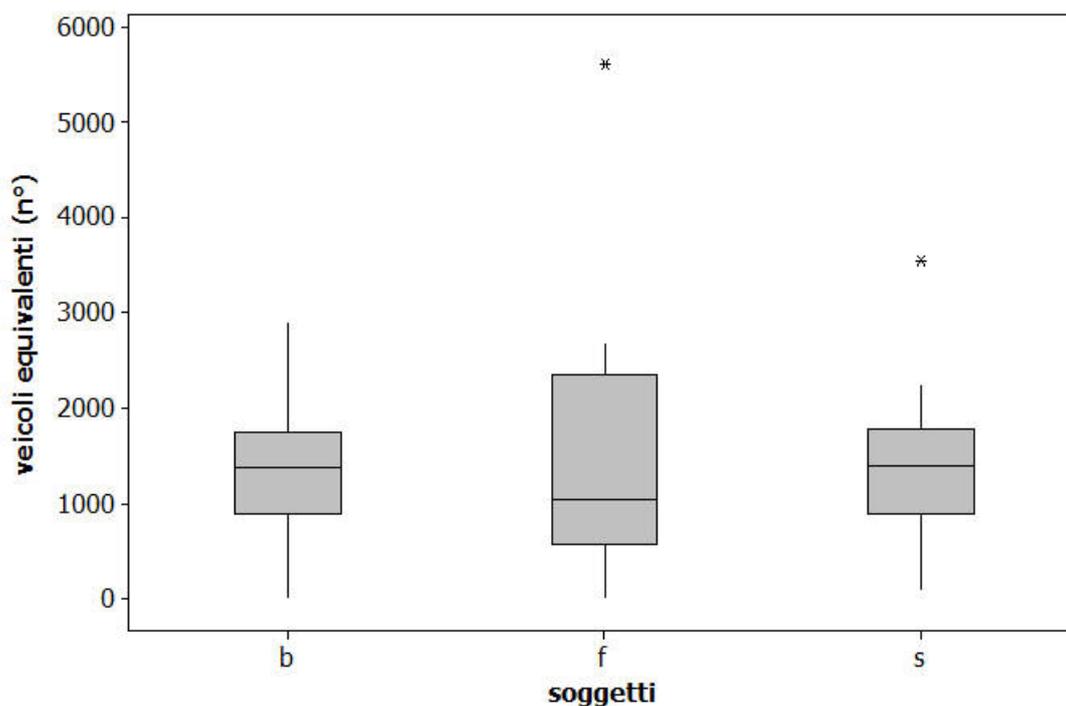
**Figura 12.** Grafico della frequenza dei soggetti affetti da BPCO (b), fumatori (f) e non fumatori (s) ai livelli di esposizione a traffico elevati, moderati o trascurabili calcolati in base alla distanza dell'abitazione dalla strada principale.

Per verificare se vi erano differenze tra BPCO, fumatori e non fumatori riguardo l'esposizione a traffico si è eseguito il test del Chi-quadro. Il risultato Chi-quadro = 7.328 con  $p = 0.120$  indica che tra questi tre gruppi di soggetti non vi sono significative differenze di esposizione a traffico in termini di distanza dell'abitazione dalla strada principale.

Tra FEV1 (%) e la distanza dell'abitazione dalla strada principale non vi è una correlazione significativa.

Per un'analisi più accurata si individueranno gli indirizzi mediante il Geographic Information System (GIS) software ArcGIS che consentirà di avere una risoluzione di 3 m.

Un altro indice di esposizione a traffico che è stato impiegato è la misura del flusso di traffico in veicoli equivalenti. Questa non è risultata significativamente diversa tra i tre gruppi di soggetti (Fig.13), nonostante un *outliers* tra i fumatori e uno tra i non fumatori sani

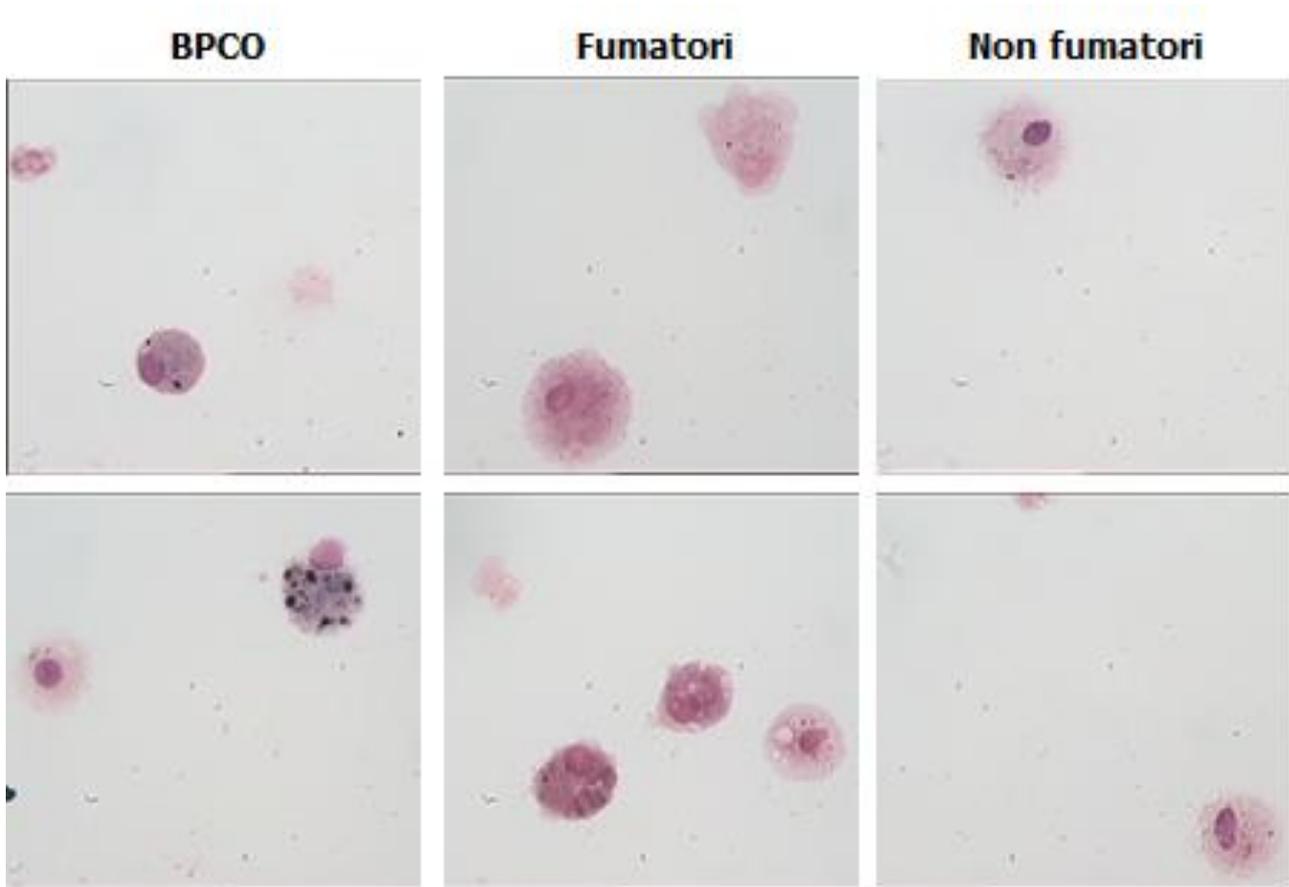


**Figura 13.** Grafico a scatola e baffi del flusso di traffico, espresso in veicoli equivalenti, a cui è esposto ogni gruppo di soggetti (b: BPCO; f: fumatori; s: non fumatori sani). Viene marcata la mediana per ciascun gruppo e i baffi rappresentano l'intervallo in cui si distribuiscono i dati. \* indica i valori *outliers*.

Tra FEV1 (%) e il flusso di traffico, espresso in veicoli equivalenti, non vi è una correlazione significativa, proprio ad indicare che l'ostruzione delle vie aeree è indipendente dall'esposizione cronica a traffico urbano.

### ***Analisi del carbon load***

Si è analizzato il contenuto di particelle carboniose nei macrofagi dell'espettorato indotto nei soggetti affetti da BPCO, nei fumatori sani e nei controlli sani (Fig 14).



**Figura 14.** Il pannello illustra a titolo esemplificativo due fotografie al microscopio ottico di macrofagi appartenenti a soggetti BPCO, due foto di cellule di fumatori e due di non fumatori in cui è possibile apprezzare le particelle nere carboniose.

Mediamente il 75% di macrofagi presenta nel citoplasma particelle carboniose e non vi sono differenze statisticamente significative tra i tre gruppi di soggetti per la positività al BC.

Per ogni paziente si sono sommate le aree delle particelle carboniose ( $\mu\text{m}^2$ ) relative a ciascun macrofago (Tab 16-18). Di questi 50 valori ottenuti si è calcolata la media e la mediana per stabilire il contenuto di BC di ciascun soggetto. Il BC nei macrofagi per ogni soggetto può anche essere espresso semplicemente come somma dell'area di tutte le particelle carboniose del campione in esame ( $\mu\text{m}^2$ ). Poiché si è osservato che la somma delle aree citoplasmatiche analizzate tra i soggetti con BPCO ( $19924 \pm 5637$ ) e i fumatori era significativamente diverso ( $23359 \pm 7013$ ,  $p < 0.05$ ), si è calcolata per ogni macrofago la percentuale dell'area di citoplasma occupata dalle particelle carboniose e si è fatta la media e la mediana per i 50 macrofagi analizzati di ogni paziente.

	<b>Media</b>	<b>SE</b>	<b>Mediana</b>	<b>IQR</b>	<b>Minimo</b>	<b>massimo</b>
<b>Cell con BC (%)</b>	76.6	2.2	76.0	14.0	64.0	92.0
<b>Contenuto medio di BC per macr (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	5.07	1.05	4.01	2.31	1.22	16.44
<b>Contenuto mediano di BC per macr (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	1.05	0.11	1.01	0.72	0.52	1.83
<b>Somma area particelle (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	223.7	32.2	198.7	116.5	60.8	497.4
<b>Somma area macr (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	19592	1711	19924	5637	8375	32397
<b>Media area carb/area citopl (%)</b>	1.07	0.16	0.93	0.85	0.38	2.39
<b>Mediana area carb/area citopl (%)</b>	0.27	0.04	0.27	0.18	0.09	0.60

**Tabella 16.** Statistica descrittiva riguardante il BC per i soggetti affetti da BPCO.

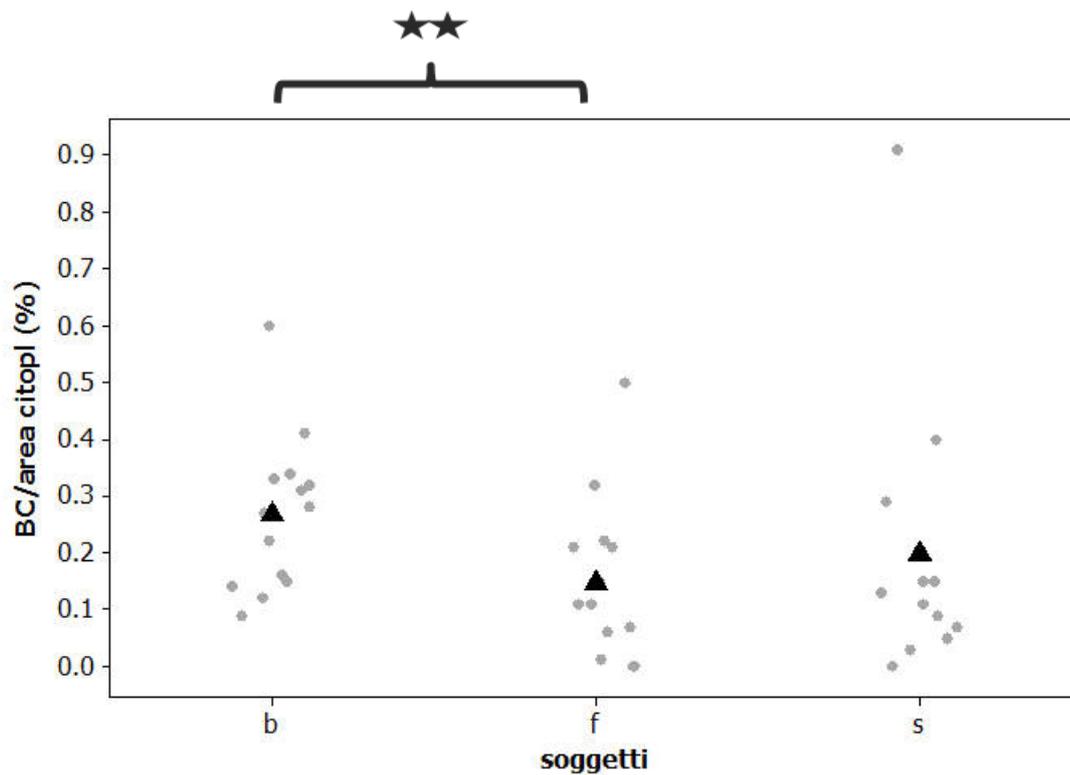
	<b>Media</b>	<b>SE</b>	<b>Mediana</b>	<b>IQR</b>	<b>Minimo</b>	<b>massimo</b>
<b>Cell con BC (%)</b>	73.7	4.5	73.0	21.5	40.0	100.0
<b>Contenuto medio di BC per macr (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	3.01	0.63	1.85	2.91	0.55	8.13
<b>Contenuto mediano di BC per macr (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0.98	0.26	0.72	1.11	0	3.34
<b>Somma area particelle (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	150.4	31.4	92.6	145.2	27.3	406.6
<b>Somma area macr (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	24446	1645	23359	7013	12686	37110
<b>Media area carb/area citopl (%)</b>	0.50	0.11	0.35	0.53	0.09	1.61
<b>Mediana area carb/area citopl (%)</b>	0.23	0.08	0.13	0.18	0	1.14

**Tabella 17.** Statistica descrittiva riguardante il BC per i soggetti fumatori.

	<b>Media</b>	<b>SE</b>	<b>Mediana</b>	<b>IQR</b>	<b>Minimo</b>	<b>massimo</b>
<b>Cell con BC (%)</b>	75.8	3.1	77.0	14.5	60.0	100.0
<b>Contenuto medio di BC per macr (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	2.80	0.53	2.36	3.21	0.27	6.52
<b>Contenuto mediano di BC per macr (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	0.90	0.25	0.57	0.81	0.12	3.03
<b>Somma area particelle (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	146.6	24.6	117.8	129.3	44.6	326.2
<b>Somma area macr (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	23426	1312	22686	7104	16053	30816
<b>Media area carb/area citopl (%)</b>	0.63	0.14	0.50	0.55	0.16	1.90
<b>Mediana area carb/area citopl (%)</b>	0.26	0.08	0.14	0.30	0.03	0.91

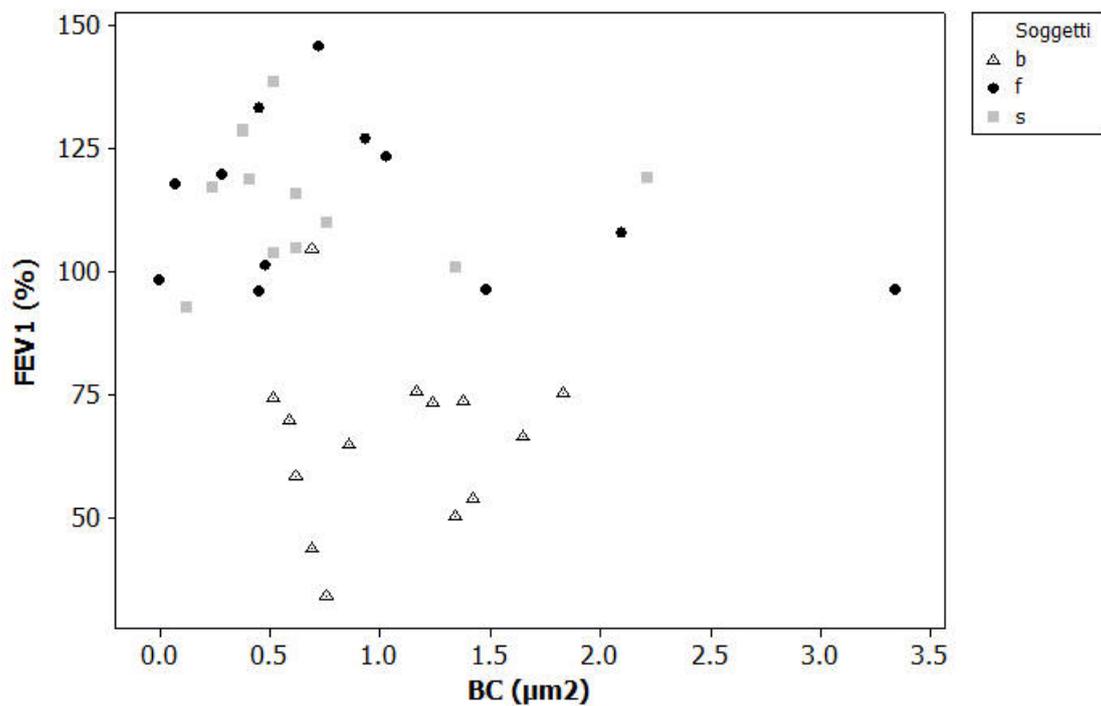
**Tabella 18.** Statistica descrittiva riguardante il BC per i soggetti non fumatori sani.

L'area media occupata dal BC (%) è risultata più elevata nei pazienti con BPCO (0,93, [0,61-1,46]) rispetto ai soggetti fumatori (0,35 [0,17-0,58],  $p < 0.01$ ) (Fig 15).



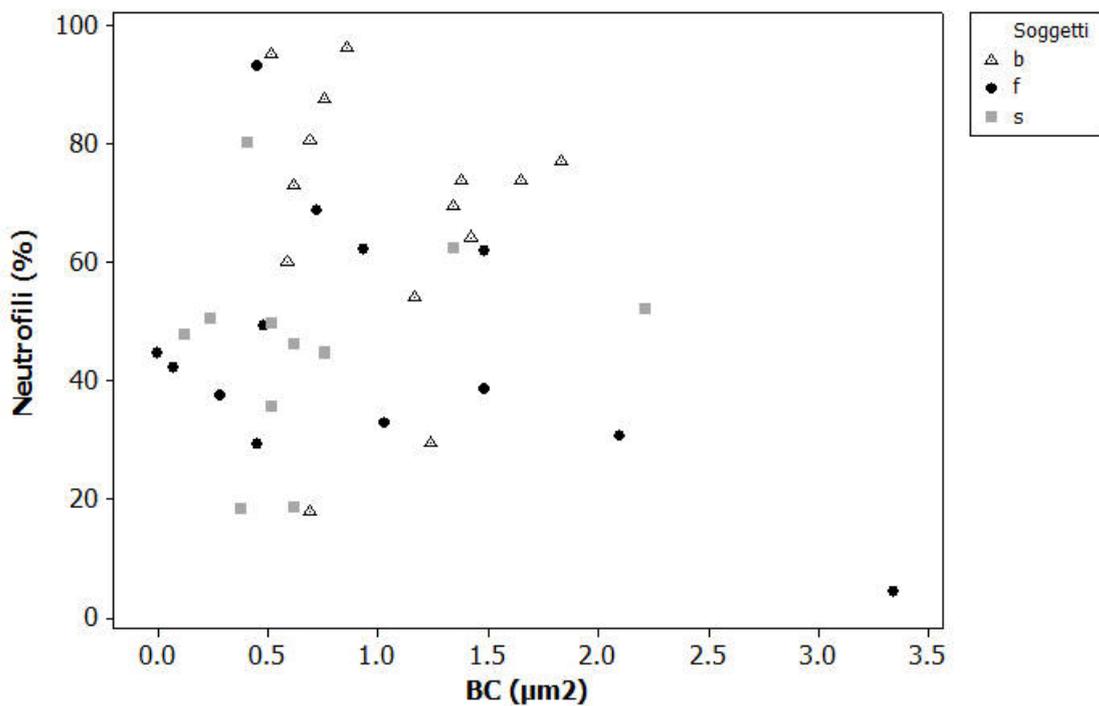
**Figura 15.** Grafico a punti dell'area dei macrofagi occupata dal BC in percentuale per i BPCO e i fumatori. Viene marcata con ▲ la mediana per ciascun gruppo, ★ ★ indica  $p < 0.01$ .

Tra tutti i soggetti si è studiata la correlazione tra la funzionalità respiratoria (FEV1) e il carbon load, ma non si ottiene un risultato statisticamente significativo, i dati sono molto dispersi (Fig. 16).

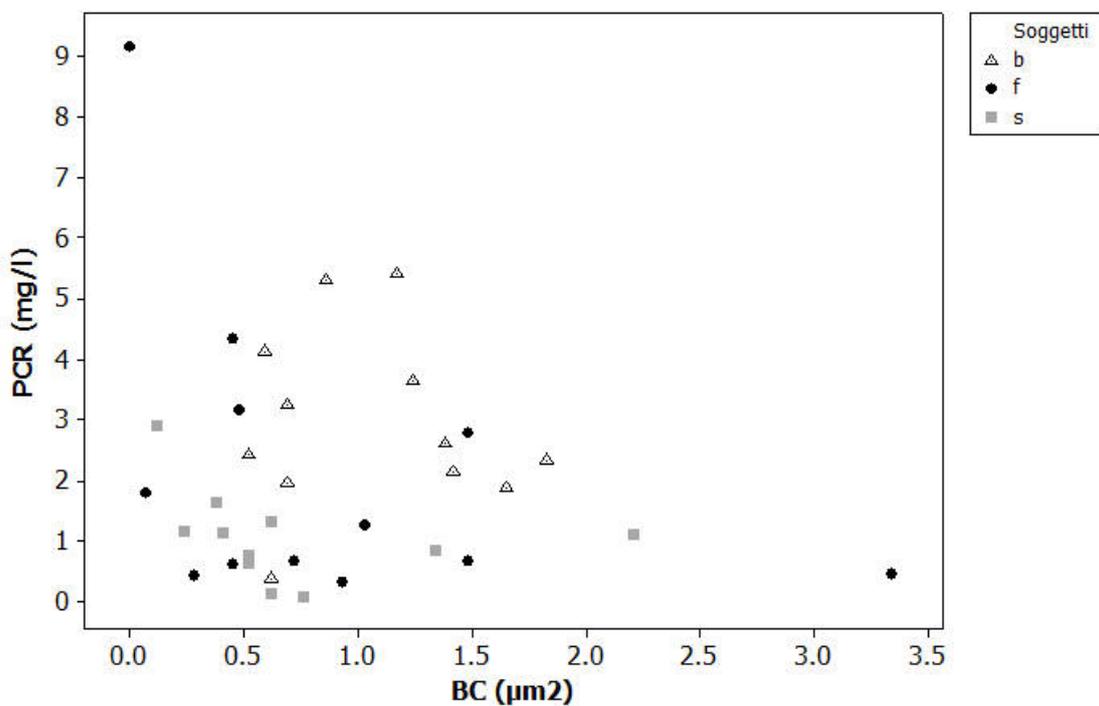


**Figura 16.** Grafico a punti del carbon load in relazione alla funzionalità respiratoria misurata con il FEV1%.  $\mu\text{m}^2$

Anche la percentuale di neutrofili nell'espettorato indotto e la misura della PCR nel sangue non correlano con il carico di particelle carboniose (Fig. 17 e 18). Il carbon load non risulta quindi influenzato né da infiammazione locale né da quella sistemica.

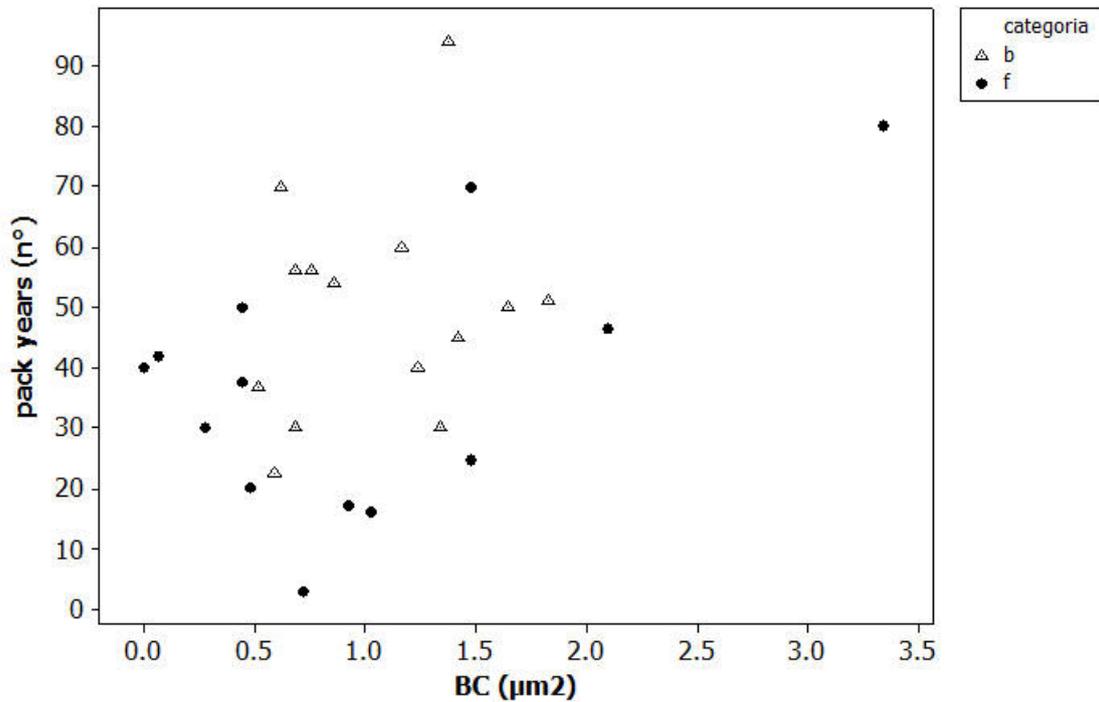


**Figura 17.** Grafico a punti del carbon load in relazione alla percentuale di neutrofili, usato come indice di infiammazione locale.



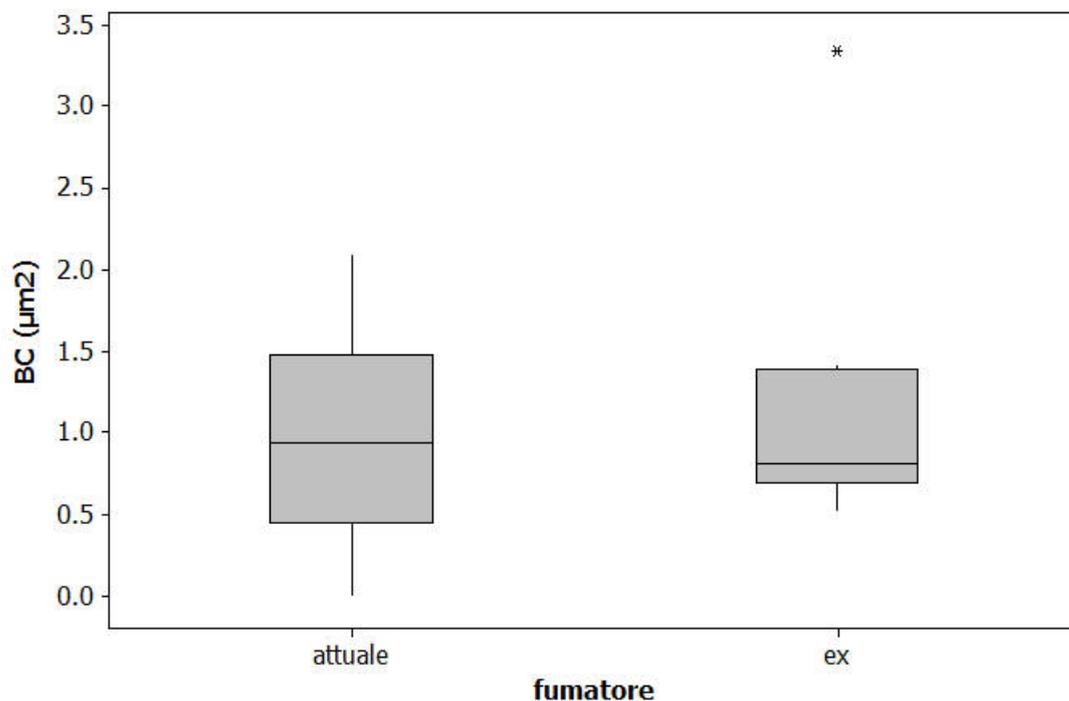
**Figura 18.** Grafico a punti del carbon load in relazione alla concentrazione di PCR ematico, usato come indice di infiammazione sistemica.

Per i soggetti fumatori tra carbon load e numero di pacchetti di sigarette fumati all'anno non vi è alcuna correlazione significativa (Fig. 19).



**Figura 19.** Grafico a punti del carbon load in relazione alla storia di fumo valutata con il conteggio dei pack years.

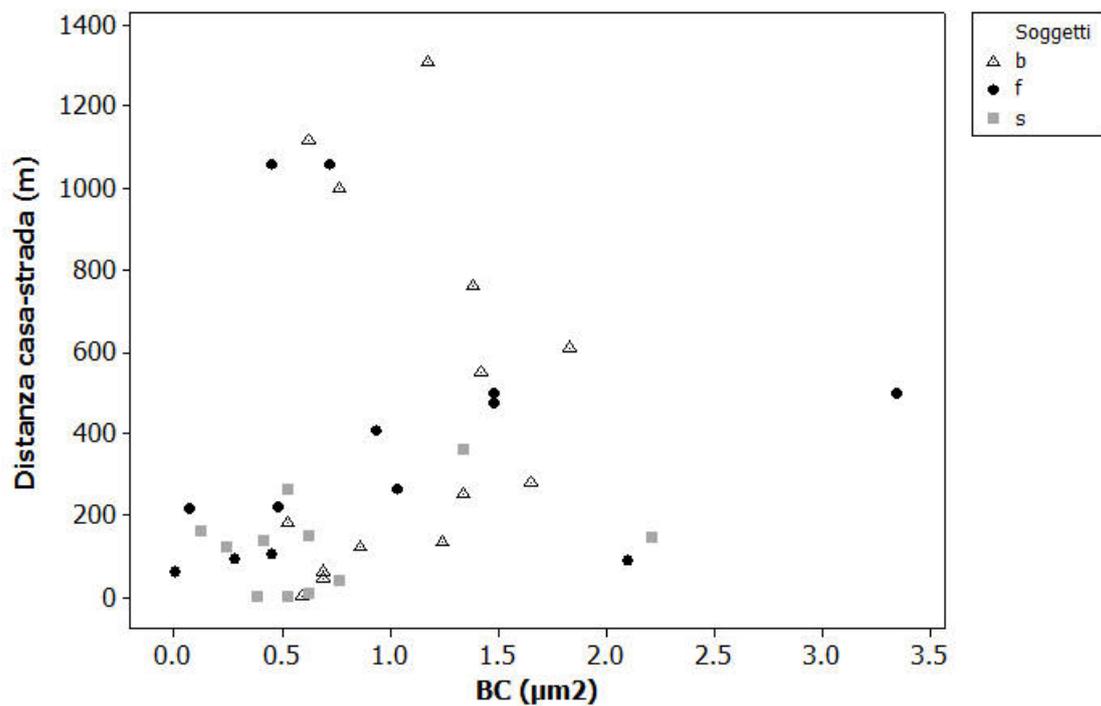
Tutti i soggetti fumatori (sia BPCO che sani) sono stati suddivisi in attuali fumatori o ex-fumatori. Gli attuali fumatori rappresentano complessivamente il 64% dei soggetti che sono suddivisi nel 43% dei soggetti con BPCO e nell'86% dei fumatori sani. Tra gli attuali fumatori o ex-fumatori non si osserva nessuna differenza significativa nel contenuto mediano di particelle carboniose (Fig. 20).



**Figura 20.** Grafico a scatola e baffi carbon load per ogni gruppo di soggetti (at: attuale fumatore; ex: ex-fumatore). Viene marcata la mediana per ciascun gruppo e i baffi rappresentano l'intervallo in cui si distribuiscono i dati. \* indica i valori outliers.

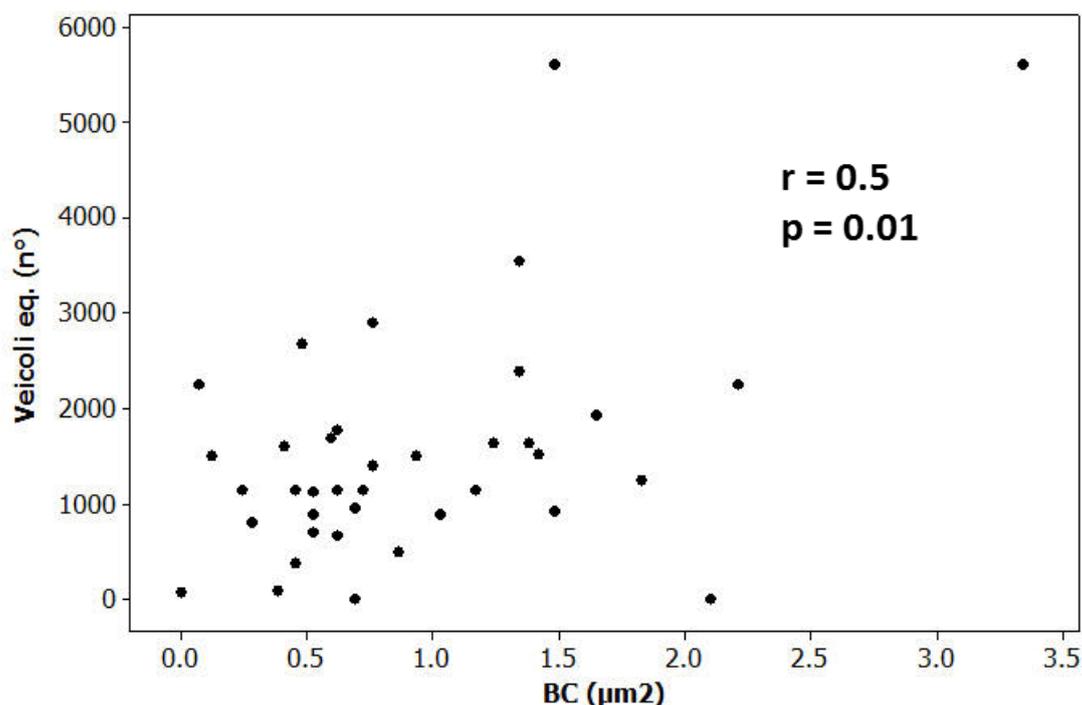
Le concentrazioni di PM10, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub> nell'aria misurate dalla centralina più vicina alla residenza di ciascun soggetto non hanno una correlazione significativa con il carico di particelle carboniose.

Il carico di particelle carboniose non ha una correlazione significativa con la distanza dell'abitazione di ciascun soggetto dalla strada principale (Fig. 21).



**Figura 21.** Grafico a punti del carbon load in relazione alla distanza tra la residenza e la strada principale più vicina a questa per ciascun soggetto.

Il carico di particelle carboniose ha una correlazione significativa ( $p = 0.01$ ) con il flusso di traffico espresso in veicoli equivalenti (Fig. 22).



**Figura 22.** Grafico a punti del carbon load a cui è esposto ciascun soggetto (espresso in veicoli equivalenti) in relazione al flusso di traffico espresso in veicoli equivalenti.

In conclusione, i soggetti con BPCO mostrano un aumento del carico di particelle carboniose negli AM che non si spiega con l'abitudine al fumo. L'esposizione al fumo di sigaretta non contribuisce a determinare il carico di particelle carboniose nei soggetti sani.

Questi risultati suggeriscono che i pazienti con BPCO possano avere un maggiore assorbimento delle particelle e/o un difetto nello smaltimento di queste da parte dei macrofagi.

L'esposizione cronica a inquinamento urbano, valutata con gli abituali metodi di campionamento ambientale, con la misura della distanza dell'abitazione dalla strada principale e con il flusso di traffico, non determina alterazioni delle prove di funzionalità respiratoria e dei marcatori di infiammazione nel plasma e nell'espettorato indotto.

Il conteggio di particelle carboniose nei macrofagi polmonari essendo correlato con il flusso di traffico a cui è esposto ciascun soggetto può rappresentare un valido indice di esposizione a traffico urbano.

## DISCUSSIONE

In questo studio si è osservato come i maggiori determinanti del contenuto di BC nei macrofagi delle vie aeree siano la presenza di BPCO e l'esposizione al traffico urbano, mentre non è stato dimostrato un ruolo dell'abitudine al fumo di sigaretta. Inoltre, per quanto concerne la BPCO, l'accumulo non risulta correlato con il grado di ostruzione né con il grado di infiammazione neutrofila delle vie aeree.

Gli studi attualmente pubblicati riguardanti la valutazione del BC nei macrofagi delle vie aeree sono pochi ed eterogenei. Kulkarni e collaboratori [94] hanno comparato il contenuto di BC in donne e bambini etiopi, esposti a inquinamento da biomasse, con adulti e bambini inglesi esposti a PM derivato da combustibili fossili, dimostrando che il BC è maggiore negli adulti africani. Ciò suggerisce un ruolo importante dell'inquinamento *indoor*. Ha inoltre evidenziato una maggiore quantità di BC nelle madri etiopi rispetto ai loro figli, suggerendo che tale differenza sia imputabile al maggior numero di anni di esposizione al PM. Lo stesso gruppo, nel 2006 [96], ha stabilito un'associazione dose-dipendente inversa tra il contenuto di BC nei macrofagi e la funzionalità polmonare in bambini sani e asmatici. La quantità di BC contenuto nei macrofagi delle vie aeree era minore nei bambini con asma rispetto ai sani, nonostante questi ultimi fossero esposti a livelli di PM superiori, suggerendo che la fagocitosi delle particelle carboniose da parte dei macrofagi possa essere alterata nell'asma. Grigg e collaboratori [97], in un campione di bambini sani, hanno messo in relazione l'area media del BC macrofagico e la concentrazione di PM<sub>10</sub> stimata nel punto dell'abitazione di ciascun soggetto tramite un modello di dispersione atmosferico. Anche in questo caso il contenuto di BC era associato ad una riduzione della funzionalità polmonare. Non è invece stata dimostrata alcuna relazione tra i marcatori di infiammazione delle vie aeree e il contenuto di BC, coerentemente con i nostri risultati.

Fullerton [95] ha osservato in volontari adulti sani, che il BC dei macrofagi è associato con la combustione di biomasse in ambienti chiusi, sottolineando l'importanza dell'inquinamento *indoor*. Nel 2010, Jacobs e collaboratori [98] hanno valutato se l'esposizione a PM potesse influire sullo stato protrombotico e sulla funzionalità piastrinica in una coorte di soggetti diabetici. In questo studio la valutazione dell'esposizione prevedeva sia un'analisi dei livelli di background del PM<sub>10</sub> e PM<sub>2,5</sub> mediante modelli di dispersione, sia misurazioni personali ottenute tramite analizzatori portatili. È risultata un'associazione positiva tra le esposizioni acute a PM<sub>10</sub> e la conta ematica dei leucociti. I soggetti inoltre sono stati sottoposti al test dell'espettorato indotto per la valutazione del BC ed è stata dimostrata un'associazione tra contenuto di PM nei macrofagi e i livelli di leucociti nel sangue. Successivamente, lo stesso gruppo ha riscontrato un'associazione positiva tra la quantità

di BC in soggetti non fumatori e i livelli plasmatici di LDL ossidate, suggerendo un effetto aterogeno del PM. Questi 2 studi dimostrano come l'esposizione a PM sia associata all'infiammazione sistemica. Ciò è in contrasto con i nostri risultati, basati però sulla concentrazione sierica di PCR come marker d'infiammazione e non sulla conta dei leucociti nel sangue periferico. Nel 2012 Kalappanavar e collaboratori [115] hanno dimostrato, in un campione di soggetti pediatrici, un'associazione dose-dipendente inversa tra la quantità di BC nei soggetti provenienti dalle zone industriali, rispetto a quelli provenienti dalle zone "verdi". In tale studio la quantità di BC nei macrofagi non è stata valutata mediante un software ma direttamente da un operatore che ha classificato il contenuto di BC in alto, medio e basso. Nonostante ciò i risultati ottenuti erano coerenti con quelli Grigg e discordanti dai nostri. Ciò potrebbe essere dovuto all'età dei soggetti, ma soprattutto i nostri valori potrebbero risentire del fatto che la pianura padana è un'area particolarmente critica per l'inquinamento ambientale, per la peculiarità dello strato di rimescolamento dell'atmosfera che determina una diffusione omogenea delle polveri e degli inquinanti gassosi, con variazioni locali scarsamente significative [107]. Le associazioni tra BC e valori spirometrici di questi studi sono in disaccordo con uno studio inglese su soggetti adulti [5] e con la nostra valutazione. Nello studio inglese, oltre ad analizzare l'ammontare di BC nei macrofagi delle vie aeree, è stata comparata la dose inalata di PM in un gruppo di ciclisti e in uno di non ciclisti utilizzando un monitoraggio dell'inquinamento a cui era esposto ciascun soggetto con analizzatori portatili della qualità dell'aria. È stato dimostrato come le esposizioni a PM10 non fossero sensibilmente diverse nei 2 gruppi. Tuttavia i ciclisti sono stati trovati avere una quantità di BC superiore ai non ciclisti, suggerendo che l'entità e la distribuzione della ventilazione con l'esercizio fisico siano fattori determinanti l'accumulo di BC nei macrofagi delle vie aeree.

Nella nostra analisi è stato considerato come rappresentativo un campione di 50 cellule, in analogia con alcuni autori [95], ma in contrasto con altri, che ne valutano 100 [96, 97]. Poiché nei soggetti con BPCO la maggioranza delle cellule infiammatorie è rappresentata da neutrofili, la dimostrazione che l'analisi di 50 macrofagi è sufficiente per avere misure di BC affidabili è importante in quanto permette di poter studiare un maggior numero di soggetti.

La relazione tra BC nei macrofagi ottenuti tramite espettorato indotto ed esposizione al traffico veicolare è coerente con i dati che il BC, nei paesi sviluppati, è un inquinante che deriva principalmente dalle emissioni degli autoveicoli [101]. In letteratura non ci sono attualmente studi che abbiano definito precisamente l'origine dei depositi carboniosi nei macrofagi delle vie aeree.

Nel presente studio è stato utilizzato come indice del flusso di traffico della strada principale più vicina alla residenza dei soggetti il numero di veicoli equivalenti. Questi dati sono stati ottenuti dal Piano Provinciale della Viabilità pubblicato nel 2012. In futuri studi sarebbe utile un monitoraggio

della viabilità riferito ad un arco temporale maggiore per una più accurata stima dell'esposizione ad un flusso medio di traffico.

Per quanto riguarda il ruolo del fumo di sigaretta, non è mai stato finora indagato come influenzi la quantità di BC nei macrofagi. Nel nostro studio non è stata osservata una differenza di BC tra fumatori e non fumatori. Questo dato è sufficientemente solido perché i tre gruppi non sono differenti in maniera significativa per altre variabili confondenti quali la zona abitativa, l'esposizione legata agli spostamenti quotidiani, l'inquinamento *indoor* e i livelli medi annuali di esposizione a PM10, NO2 e SO2.

La spiegazione della scarsa influenza del fumo sul particolato carbonioso macrofagico non è possibile con uno studio osservazionale di questi tipo. Si può ipotizzare che la quota di BC nel fumo di sigaretta sia trascurabile oppure che i macrofagi dei fumatori abbiano una ridotta capacità di fagocitosi o che vi sia un più rapido turnover dei macrofagi nei soggetti fumatori rispetto ai sani. In letteratura mancano inoltre studi che abbiano definito il ruolo del BC nei soggetti con BPCO. Il maggior carico di BC nella BPCO non è spiegabile con fattori esogeni, in quanto fumatori con e senza BPCO erano confrontabili per abitudine al fumo, esposizione *indoor* e *outdoor* (PM10, NO2, SO2, distanza dalla strada principale, traffico veicolare e esposizione legata ai mezzi di trasporto). Pertanto le ipotesi per spiegare questa osservazione sono che nei soggetti con BPCO ci sia o una maggiore capacità di queste cellule di fagocitare le particelle carboniose o un minor tasso di eliminazione dei macrofagi carichi di carbone dalle vie aeree. La prima possibilità sembra meno probabile in quanto è noto che il fumo di sigaretta inibisce la funzione macrofagica [116, 117].

I risultati di questo studio suggeriscono che l'origine dei depositi carboniosi nei macrofagi delle vie aeree sia dovuto all'inalazione di prodotti di combustione del traffico veicolare. Quindi la quantificazione del BC nei macrofagi risulta adatta a stabilire l'entità della dose effettivamente accumulata nell'organo bersaglio. La spiegazione dei dati ottenuti nei fumatori e BPCO necessita di ulteriori studi sulla funzionalità dei macrofagi nei soggetti con e senza malattia.



### **PARTE III**

#### **Effetto del fumo e/o della malattia (BPCO) sulla colonizzazione microbica a livello polmonare.**

#### **INTRODUZIONE**

La colonizzazione batterica e l'infezione sono caratteristiche nella BPCO. Mentre è noto il ruolo dei batteri nelle esacerbazioni della BPCO, il significato dell'infezione per lo sviluppo e l'evoluzione della malattia rimane più controverso [118].

Nei soggetti con BPCO la difesa innata del polmone è compromessa in seguito all'esposizione al fumo o ad altri irritanti ambientali. Il fallimento della difesa polmonare in questi soggetti deriva da due distinti cicli di infezione che possono contribuire alla perdita progressiva della funzionalità polmonare. Il ciclo acuto è ben noto: il polmone nei BPCO diventa suscettibile a ripetute infezioni acute della mucosa delle vie aeree con virus e batteri patogeni, che provocano episodi di aumentata infiammazione e peggioramento dei sintomi clinicamente diagnosticati come esacerbazioni di BPCO. L'altro ciclo di infezione è meno caratterizzato ed è quello cronico, definito anche come "ipotesi del circolo vizioso". Secondo tale ipotesi, la risposta immunitaria innata del polmone viene compromessa dal fumo, ciò permette ai patogeni microbici di stabilirsi nel tratto respiratorio più profondo e questi provocano un aumento di secrezione di muco, alterano l'attività delle ciglia e danneggiano l'epitelio delle vie aeree. La colonizzazione microbica può così perpetuarsi e la presenza cronica di batteri in questi pazienti induce infiammazione e può contribuire alla progressiva ostruzione delle vie aeree e al caratteristico danno polmonare della BPCO [119]. Tuttavia il ruolo del microbiota del polmone rimane ancora poco chiaro nella patogenesi e nella progressione della BPCO.

Poiché è stato stimato che oltre il 70% delle specie batteriche sulle superfici del corpo non possono essere coltivate con le tecniche attualmente disponibili, le tecniche di coltura tradizionali non rappresentano più lo standard per le indagini microbiche [120]. Infatti, solo metodi molecolari, come il sequenziamento del gene rRNA 16S con il "sequenziamento di nuova generazione" (NGS) consentono di studiare il microbioma nel sistema respiratorio [121].

I metodi tradizionali per identificare i batteri sono basati sulla coltura, l'osservazione della morfologia delle colonie e sull'esecuzione di test di conferma biochimici. La classificazione più accurata dei batteri si ottiene con l'analisi del loro materiale genetico. I microrganismi furono inizialmente classificati sulla base del contenuto in guanina e citosina, ma questo procedimento è stato in gran parte abbandonato a favore di metodi più discriminanti. L'ibridazione del DNA è stata usata per identificare direttamente microrganismi in campioni clinici, evitando la crescita in coltura

del microrganismo, ed è risultata uno strumento particolarmente valido per la rapida identificazione di microrganismi a lenta crescita come i micobatteri e i funghi. Un'estensione del metodo di ibridazione è l'analisi di sequenze di acidi nucleici. Si utilizzano sonde per localizzare sequenze specifiche di acidi nucleici che sono peculiari per un genere, una specie o una sottospecie. Queste sequenze vengono prima amplificate in modo da ottenere milioni di copie e successivamente sequenziate per caratterizzare specificatamente il tipo di microrganismo isolato. Con questo test si studiano principalmente sequenze di DNA ribosomiale [122]. La parte di DNA più comunemente impiegata per i batteri attualmente è la sequenza del gene per l'rRNA 16S in quanto permette la differenziazione tra organismi a livello di genere, specie e sotto specie. L'rRNA 16S codifica per la subunità piccola (30S) del ribosoma procariota, quindi è presente in tutti i microorganismi, e il gene è composto da 1542 nucleotidi. Poiché deve assumere una determinata struttura tridimensionale per assolvere la sua funzione l'rRNA 16S ha un basso tasso di mutazione, infatti la maggior parte delle mutazioni producono ribosomi non funzionanti e non vengono trasmesse alla progenie. Per amplificare il gene dell'rRNA 16S vengono usati primer posizionati in zone conservate del gene. Confrontando la sequenza di questo gene di diversi batteri è possibile quantificarne la distanza filogenetica, determinare la diversità tra microrganismi e identificare un batterio [123]. Un batterio con difficoltà di crescita in normali condizioni di laboratorio può non essere identificato. Invece metodi molecolari, come il sequenziamento dei geni dell'rRNA 16S, permettono di identificare ceppi poco descritti, raramente isolati e fenotipicamente aberranti e possono portare alla scoperta e descrizione di nuovi patogeni [124, 125].

Recentemente sono stati sviluppati dei metodi di NGS. Queste tecnologie più nuove prevedono una combinazione di diverse strategie di preparazione delle librerie di acidi nucleici, di sequenziamento, di analisi di immagine, di allineamento di genomi e di assemblaggio [126]. Tra queste tecnologie commercialmente disponibili vi è lo strumento 454 fornito dalla Roche (Roche Applied Sciences, Branford, CT). Questo permette di sequenziare singole molecole all'interno di una miscela, ovvero ogni frammento di DNA viene sequenziato individualmente consentendo l'identificazione di varianti rare. Secondo questa tecnologia vengono clonate istantaneamente centinaia di migliaia di molecole attraverso una PCR in emulsione, a differenza del metodo di Sanger dove si ha il sequenziamento diretto dei prodotti di PCR che risulta perciò in una lettura di sequenza che è una media di tutte le molecole nella miscela. Per sequenziare le molecole col metodo di Sanger queste dovrebbero essere prima clonate in un vettore plasmidico. La tecnologia dello strumento 454 rispetto al sequenziamento col metodo di Sanger consente quindi un risparmio di tempo e costi [126].

Il microbioma respiratorio è stato studiato con tecnologia 454 nelle secrezioni delle vie aeree da pazienti con fibrosi cistica, asma e altre malattie delle vie respiratorie croniche (ad esempio, dopo il trapianto per bronchiolite obliterante). In tabella 19 sono riportati i lavori pubblicati con tecnologia 454 che interessano soggetti BPCO e controlli secondo il tipo di campione analizzato.

Articolo	Campione analizzato	Soggetti reclutati			
		BPCO			
Aguirre E 2015 [132]	Espettorato	BPCO			
Millares L 2014 [130]	Espettorato	BPCO			
Garcia-Nunez M 2014 [131]	Espettorato	BPCO			
Park H 2014 [150]	Tampone orofaringeo	BPCO		Sani	Asmatici
Morris A 2013 [151]	BAL, lavaggio orale		Fumatori	Sani	
Galiana A 2012 [129]	Espettorato	BPCO			
Cabrera-Rubio R 2012 [128]	Espettorato indotto, bronco aspirato, BAL, mucosa bronchiale	BPCO			
Pragman AA 2012 [149]	BAL	BPCO	Fumatori	Sani	
Charlson ES 2011 [133]	Lavaggio orale tamponi nasofaringei e orofaringei BAL brushing			Sani	
Erb-Downward JR 2011 [127]	BAL espianti	BPCO	Fumatori	Sani	
Charlson ES 2010 [16]	Tamponi nasofaringei e orofaringei		Fumatori	Sani	

**Tabella 19:**

Studi riguardanti l'analisi del microbioma polmonare con tecnologia 454 in soggetti BPCO e controlli.

Erb-Downward e collaboratori hanno osservato differenze micro-anatomiche significative in comunità batteriche nello stesso polmone di soggetti con BPCO avanzata [127]. Essi hanno proposto che l'interazione tra i batteri polmonari e l'immunità dell'ospite potrebbe contribuire alla progressione della malattia localizzata, anche in assenza di riacutizzazione conclamata. L'espettorato si ottiene in maniera non invasiva ed è utile per raccogliere le secrezioni delle vie aeree da pazienti e controlli, ma al momento, solo cinque studi di NGS sono disponibili sul microbiota in pazienti con BPCO [128-132]. Purtroppo, nessuno di questi studi ha reclutato dei soggetti fumatori come controlli, quindi non hanno esaminato se l'abitudine di fumare possa avere avuto un ruolo nella colonizzazione batterica indipendentemente dalla limitazione al flusso. Il fumo è la principale causa della BPCO nei paesi sviluppati e quando le sigarette vengono fumate, sono inalate una miscela complessa di sostanze chimiche e microrganismi, poiché le sigarette ospitano una vasta gamma di potenziali patogeni [13]. Inoltre il fumo di sigaretta può incoraggiare la colonizzazione microbica promuovendo il legame di batteri patogeni alle cellule dell'epitelio orale, danneggiando la clearance mucociliare nasale, aumentando la permeabilità vascolare e dell'epiteliale alveolare, o compromettendo la risposta immunitaria contro i patogeni [14, 15]. Inoltre, si è visto che l'estratto di fumo di sigaretta influenza la sopravvivenza di specifiche specie microbiche isolate dalla cavità orale umana, promuovendo una selezione per la crescita di batteri Gram-negativi come *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella spp.* [133].

## **OBBIETTIVO**

Lo scopo di questo studio è quello di valutare, in modo non invasivo, il ruolo differenziale del fumo di sigaretta e della limitazione cronica del flusso aereo associata a vizio del fumo sulla colonizzazione batterica delle vie aeree. Pertanto, la diversità della flora batterica è stata valutata nell'IS con il NGS. Sono stati confrontati i risultati ottenuti dai pazienti con BPCO stabile e da fumatori, senza limitazione al flusso aereo, ma con analoga abitudine di fumare, e dai fumatori sani e soggetti non fumatori, abbinati per età e sesso.

## **MATERIALI E METODI**

### **Partecipanti.**

Sono stati arruolati pazienti con BPCO, fumatori con funzione polmonare nella norma e non fumatori con funzione polmonare nella norma. I criteri di inclusione per i pazienti con BPCO sono: storia di fumo corrispondente ad almeno 5 pacchetti-anno, FEV1/FVC dopo broncodilatatore <70% e FEV1 <80% del predetto, di età compresa tra i 40 e gli 85 anni, anamnesi negativa per asma bronchiale, allergie e atopia, nessuna riacutizzazione di BPCO negli ultimi due mesi, nessun trattamento con steroidi sistemici e/o antibiotici nel mese precedente la raccolta di espettorato. I pazienti sono stati inclusi nello studio se hanno prodotto un adeguato campione di espettorato e la cultura di questo è risultata negativa per i potenziali microrganismi patogeni (PPM). Sono stati considerati come PPM i batteri Gram-negativi e Gram-positivi riconosciuti come agenti che causano infezioni respiratorie quali: *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Enterobacteriaceae* [122].

Tutti i soggetti hanno firmato un consenso informato e il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Universitario ("Comitato Etico per la Sperimentazione Azienda Ospedaliera di Padova", progetto n° 1723P).

### **Disegno di studio.**

I dati sociodemografici e clinici sono stati registrati in un database, tra cui l'abitudine al fumo, la storia clinica, i sintomi respiratori e le terapie. Le misure di FVC post-broncodilatatore e di FEV1 sono state eseguite con un MasterLab Pro (Erich Jaeger GmbH, Höchberg, Germania), secondo le raccomandazioni ATS/ERS [50]. Inoltre, i soggetti con BPCO sono stati caratterizzati mediante BMI. I soggetti con BPCO (BP), i fumatori (F) e non fumatori (NF) sono stati codificati con un numero progressivo.

### **Espettorato indotto.**

I campioni di espettorato sono stati ottenuti secondo il metodo standard di selezione di frustoli di muco privi di saliva [85]. In breve, il FEV1 è stato misurato prima e 10 minuti dopo l'inalazione di salbutamolo (200 mg). La soluzione salina ipertonica è stata nebulizzata con un nebulizzatore ultrasonico (Ultra Neb 2000 De Vilbiss Sanità, Somerset, PA, USA) per 4 periodi da 5 minuti. La concentrazione di soluzione salina è stata aumentata ad intervalli di 10 min dal 3% al 4%. Ogni 5 minuti ai soggetti è stato chiesto di risciacquare la bocca e la gola e poi sono stati invitati a

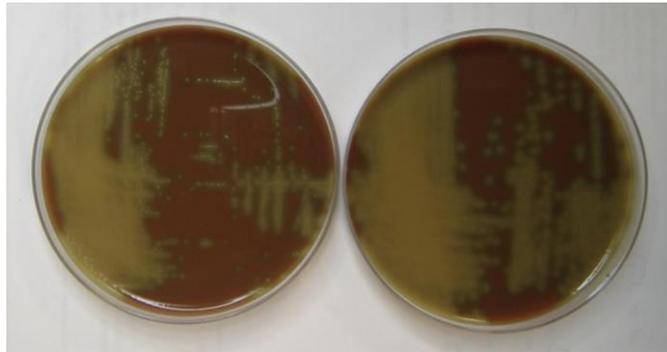
espettorare in una capsula di Petri sterile. Un'aliquota del campione di espettorato è stato coltivato in terreno selettivo, mentre un'altra porzione è stata conservata in una eppendorf sterile a -80°C fino all'analisi.

### **Esame microscopico**

Un'ansata di espettorato è stata strisciata su vetrino operando in cabina a flusso laminare, è stato fatto asciugare all'aria, successivamente fissato in metanolo e poi colorato al Gram. Si è effettuato l'esame con microscopio ottico (Leica, Wetzlar, Germany) a immersione (1000X) facendo una descrizione qualitativa e semiquantitativa dei batteri, concentrandosi sulle aree dove sono più presenti i leucociti. Sono stati annotati il tipo e la quantità di cellule e i morfotipi microbici.

### **Esame colturale**

Ciascun campione di espettorato è stato seminato sui terreni: Agar sangue, Agar cioccolato (Fig. 23), Mc Conkey e Sabouraud Dextrose Agar. Con l'ansa calibrata si sono eseguiti 10 strisci su quattro quadranti. I terreni Agar sangue, Mc Conkey e Sabouraud Dextrose Agar sono stati incubati a 37°C in atmosfera aerobia per 24 ore, mentre l'Agar cioccolato è stato incubato a 37°C in atmosfera arricchita in CO<sub>2</sub> (5-10%) per 24 ore. Per l'isolamento di Gram negativi anaerobi, soprattutto delle specie *Bacteroides* e *Prevotella*, è stato impiegato il terreno Shaedler KV agar con il 5% di sangue di pecora incubato anch'esso in anaerobiosi. Tutte le piastre sono state riesaminate anche dopo 48 ore. Per l'identificazione microbica delle colonie cresciute sono stati impiegati test biochimici in gallerie del tipo Api 20 Strep (per l'identificazione degli streptococchi e enterococchi) (Fig. 24) e Api 20 NE (per l'identificazione di Gram negativi non della famiglia delle *Enterobacteriaceae*) (Biomérieux, Durham, NC) o combinati nelle card del sistema automatizzato Vitek (Biomérieux, Durham, NC). Sono inoltre state effettuate prove di sensibilità all'optochina per l'identificazione di *Streptococcus pneumoniae* e alla bacitracina per l'identificazione dello *Streptococcus pyogenes*. Le culture sono state considerate negative quando non è stata rilevata alcuna crescita di PPM.



**Figura 23.** Piastre di agar cioccolato in cui è possibile riconoscere le colonie di *S. pneumoniae*



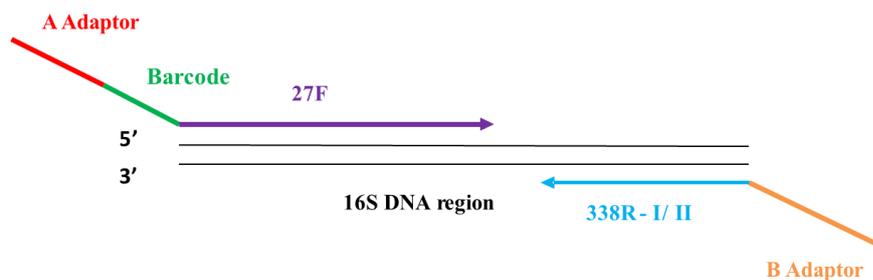
**Figura 24.** Galleria di saggi biochimici (Api20Strep) che identifica di *S. pneumoniae*.

### **Estrazione DNA**

Un'aliquota di espettorato per ciascun paziente, una volta scongelato è stata diluita in 1 ml di PBS (tampone fosfato sterile pH 7,4), gli è stato aggiunto 0,3 ml di buffer di lisi e 0,03 ml di proteasi K; sono stati spinnati e messi sul termoblocco a 56°C per 30 minuti. Il DNA totale è stato estratto con il sistema automatizzato NucliSENS easyMAG (Biomérieux, Durham, NC). Con questo apparecchio tutti gli acidi nucleici sono catturati da particelle magnetiche di silice che vengono trattenute durante i lavaggi. Un passaggio al calore permette poi agli acidi nucleici di staccarsi dalle biglie mentre queste vengono trattenute, in tal modo gli acidi nucleici possono essere eluiti e venire raccolti in apposite provette.

### **PCR per rRNA 16S**

Il gene dell'rRNA 16S è stato amplificato usando dei primer universali batteri-specifici riportati in tabella. Sono stati impiegati quattro barcode diversi in modo da permettere nelle successive fasi di sequenziamento l'analisi di quattro campioni contemporaneamente. Sono stati marcati con MID1/2/3 rispettivamente 6 campioni, mentre con il MID4 i restanti tre campioni (Fig. 25, Tab. 20).



**Figura 25.** Struttura dei *primer* impiegati.

Nome del primer	Adattatore	Barcode	Sequenza di priming
27F-MID1-A	5'-gcctccctcgcgcatcag	acgagtgcgt	agagtttgatcmtggctcag-3'
27F-MID2-A	“	acgctcgaca	“
27F-MID3-A	“	agacgcactc	“
27F-MID4-A	5'-cgtatcgcctccctcgcgcatcag	agcactgtag	“
338R-B-I	5'-gccttgccagcccgcctcag	-	gcwgccctcccgtaggagt-3'
338R-B-II	“	-	gcwgccaccctagggtgt-3'

**Tabella 20.** Sequenze dei *primer* impiegati.

I *primer reverse* sono stati usati insieme in una miscela equimolare. Si sono preparate le miscele per ciascun *primer forward* mettendo 10 µl di primer 27F MID1/2/3/4, 10 µl di primer 338R-B-I, 10 µl di primer 338R-B-II e 70 µl di H<sub>2</sub>O. A 4,9 µl di ciascuna queste miscele si sono aggiunti 105 µl di Red Taq (Sigma-Aldrich, Milano, IT) e 105 µl di H<sub>2</sub>O. Infine si sono aggiunti 3 µl di campione di DNA estratto a 30,7 µl di ciascuna miscela di reazione. Sono stati preparati anche quattro bianchi, mettendo H<sub>2</sub>O al posto del campione per ciascuna miscela di primer forward. Il termociclatore (Biorad, Herts, UK) è stato impostato per 27 cicli per una fase di denaturazione a 95°C per 6 minuti, una fase di annealing a 50°C per un minuto e una fase di allungamento a 72°C per 6 minuti. Una volta terminata la reazione di PCR i campioni sono stati caricati su gel di agarosio (1%) e sono state visualizzate le bande corrispondenti all'amplificato per ciascun paziente marcate con etidio bromuro. I campioni così amplificati sono stati conservati a 4°C fino al loro successivo utilizzo.

### Purificazione prodotti di PCR

Gli amplificati ottenuti dalla reazione di PCR sono stati purificati per mezzo di colonnine Centri-SEP (Princeton Separation, Freehold, NJ). Queste colonnine permettono di purificare il DNA per gel filtrazione eliminando più del 98% dei sali, nucleotidi trifosfato e altre impurità indesiderate a basso peso molecolare. Si tratta di colonnine con un gel secco da idratare con H<sub>2</sub>O che prima

dell'utilizzo vanno centrifugate per rimuovere il fluido interstiziale. Dopo l'aggiunta del campione, le colonnine vengono centrifugate per rimuovere le impurità e i campioni vengono eluiti in provettine che successivamente vengono stoccate a -80°C. La qualità dei frammenti di DNA amplificati è stata verificata come da protocollo per il kit dell'Agilent (Agilent Technologies, Milano, Italia).

### **Quantificazione DNA**

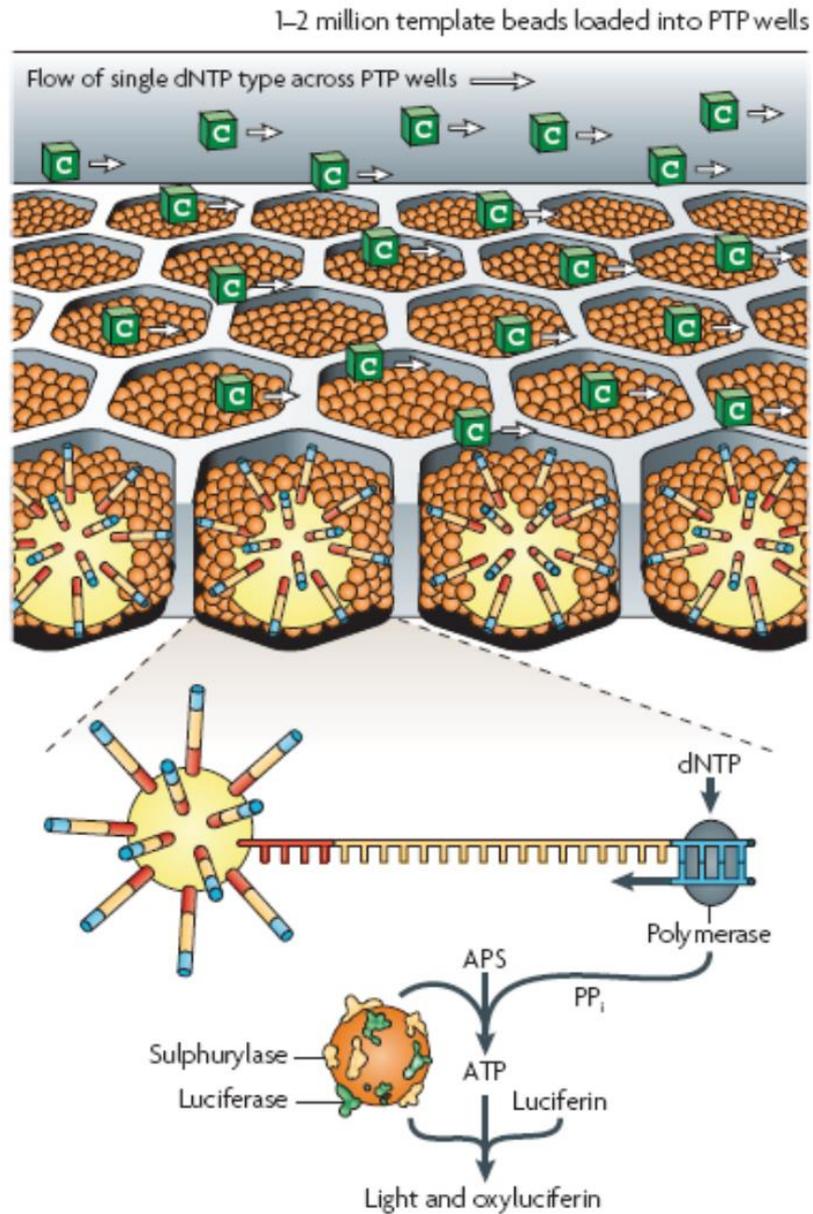
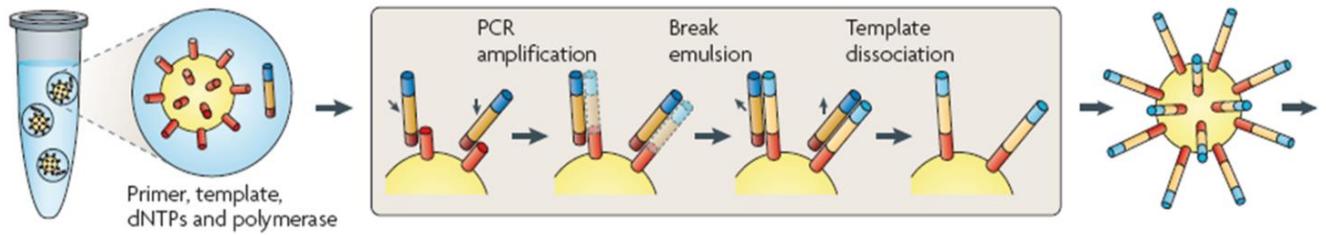
L'rRNA 16S è stato quantificato con tecnica spettrofluorimetrica mediante NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Dopo essersi costruiti una curva di calibrazione, si è quantificato il DNA per ogni campione e si sono diluiti opportunamente tutti i campioni per avere una concentrazione finale di DNA di 100 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

### **Emulsion PCR**

Si è eseguita una PCR in emulsione secondo il protocollo fornito nel kit dello strumento 454 (Roche Applied Sciences, Branford, CT). Questo prevede che i singoli filamenti di DNA vengano immobilizzati su apposite biglie per la cattura del DNA (Fig. 26). Ogni biglia porta un unico frammento di DNA a singolo filamento corrispondente ad un gene per l'rRNA 16S. I filamenti legati alle biglie vengono emulsionati con i reagenti di amplificazione in una miscela di acqua e olio creando così microreattori contenenti una sola biglia con un unico frammento del campione. In tal modo ogni singolo frammento dei campioni è stato amplificato con una reazione di PCR nel suo microreattore, escludendo le sequenze competitive o contaminanti. L'amplificazione dell'intera collezione di frammenti viene fatta in parallelo; ogni frammento viene amplificato in diversi milioni di copie per biglia. Quando poi l'emulsione viene rotta i frammenti amplificati rimangono legati alle loro biglie specifiche. Dopo una serie di lavaggi le biglie vengono recuperate e i frammenti amplificati raccolti separatamente secondo il campione di appartenenza.

### Emulsion PCR

One DNA molecule per bead. Clonal amplification to thousands of copies occurs in microreactors in an emulsion

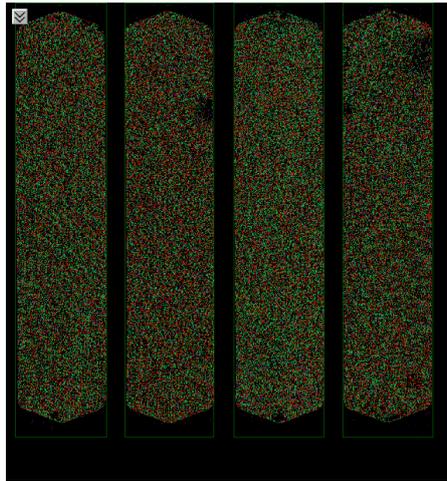


**Figura 26.** Sono illustrati i principi su cui si basa l'emulsion PCR e il pirosequenziamento.

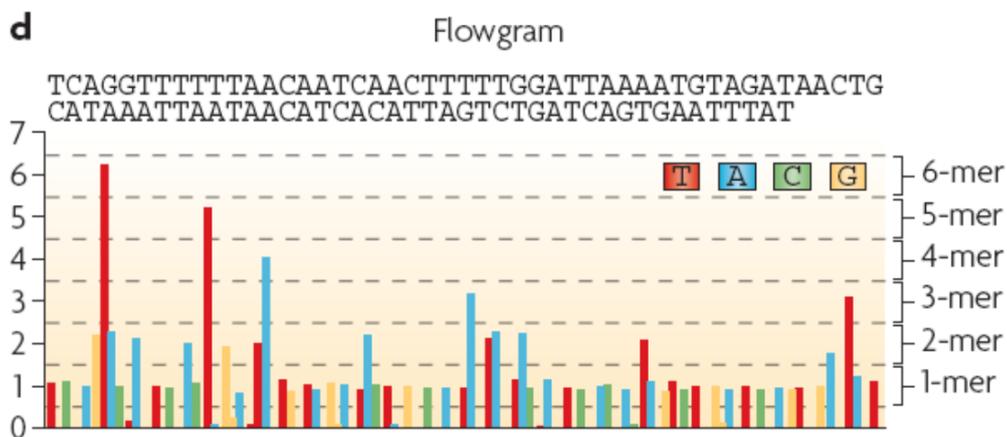
## Sequenziamento

I frammenti amplificati sono stati caricati successivamente su un dispositivo per il sequenziamento chiamato PicoTiterPlate. Il diametro dei pozzetti del PicoTiterPlate consente l'alloggio di una biglia sola per pozzetto. Il DNA è stato sequenziato eseguendo le procedure previste dal protocollo per il sequenziatore Genome Sequencer FLX (Roche Applied Sciences, Branford, CT) mediante pirosequenziamento.

Il pirosequenziamento è una tecnica per il sequenziamento del DNA che si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un dNTP al filamento polimerizzato. La sequenza da analizzare, precedentemente amplificata con la PCR, viene incubata come singola elica insieme agli enzimi DNA polimerasi, ATP solforilasi, luciferasi e apirasi e ai substrati adenosinolfosfato (ASP) e luciferina. Uno dei quattro dNTP è aggiunto alla reazione. La DNA polimerasi catalizza l'aggiunta di tale base solo se è complementare con il residuo del template. In tal caso si ha concomitante liberazione di pirofosfato inorganico PPi. Il PPi così prodotto viene trasformato in ATP ad opera della solforilasi e usando l'ASP come substrato. L'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina ad ossiluciferina ad opera della luciferasi con produzione di un segnale luminoso che viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD) (Fig. 27). L'enzima apirasi degrada il dNTP che non è stato incorporato e l'ATP prodotto dalla solforilasi. Solo quando la degradazione è terminata si aggiunge un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione. Si aggiungono ciclicamente tutti e 4 i d(NTP) fino alla deduzione completa della sequenza. Il segnale luminoso prodotto ogni volta dalla luciferina viene registrato in un apposito "pirogramma" (Fig. 28) Il segnale sarà proporzionale all'ATP prodotto e quindi al numero di nucleotidi inglobati; un picco di intensità doppia, ad esempio, rileva che nello stesso ciclo sono stati inglobati 2 dNTP (ripetizione della stessa base sul template). Viceversa un segnale nullo indica che il dNTP aggiunto in quel ciclo non è complementare. La combinazione di intensità del segnale e delle informazioni di posizione sulla PicoTiterPlate permette al software di determinare la sequenza di oltre 1.000.000 di letture con 10 ore di corsa dello strumento.



**Figura 27.** Immagine di quattro lane della PicoTiterPlate illuminate all'aggiunta di un nucleotide.



**Figura 28.** Illustrazione di un pirogramma (tratto da Nature 2010; 11: 31-46 [121]).

### Acquisizione, processamento e analisi delle sequenze

La fase di acquisizione dei dati è controllata dal software GS Sequencer fornito con lo strumento. I dati grezzi consistono in una serie di immagini digitali catturate dalla fotocamera. Le immagini sono una rappresentazione della superficie del dispositivo PicoTiterPlate su cui avvengono le reazioni di sequenziamento e ogni immagine corrisponde al flusso di un unico nucleotide su quella superficie. Se il frammento di DNA campione presente in un dato pozzetto del dispositivo PicoTiterPlate è esteso durante il flusso di un nucleotide, il pozzetto emette luce e viene catturata l'immagine corrispondente a tale flusso. La quantità di luce emessa è proporzionale al numero di nucleotidi incorporati.

La fase di processamento dei dati viene effettuata con l'applicazione GS Run Processor e converte i dati di immagine grezza a risultati chiamati "di base", utili successivamente per l'impiego da parte di applicazioni di analisi dei dati. Il processamento dei dati avviene in due fasi principali:

l'elaborazione delle immagini ed l'elaborazione dei segnali. Il software prima identifica la localizzazione dei pozzetti e misura la quantità di luce emessa nel posto di ogni pozzetto durante ogni flusso. Queste informazioni vengono poi utilizzate per determinare la sequenza dei frammenti di DNA situati in ciascun pozzetto. L'analisi dei dati è stata svolta secondo il protocollo "Amplicon".

Infine viene impiegato il database RDP Multiclassifier per un'ulteriore fase di processamento della sequenza, in cui vengono levati la sequenza del MID e dei primer; le sequenze contenenti meno di 50 nucleotidi e quelle senza barcode o con il barcode nella posizione sbagliata vengono eliminate come letture di bassa qualità. Con RDP Multiclassifier è possibile infine allineare ogni sequenza ottenuta dalla corsa con quelle consenso presenti nel database identificative di batteri diversi.

### **Estrazione degli acidi nucleici, amplificazione per PCR del gene 16S rRNA, e sequenziamento.**

Dopo lo scongelamento del campione, il DNA totale è stato estratto con il sistema automatizzato NucliSENS easyMAG (Biomérieux, Durham, NC). Il gene rRNA 16S è stato amplificato usando un pool di primers ottenuti dalla coppia degenerata 27-F e 338-R. Degli adattatori, richiesti per la successiva fase di sequenziamento di nuova generazione, sono stati aggiunti al terminale 5'-end di entrambi i *primer forward* e *reverse*, mentre i codici a barre sono stati inseriti nei soli *primer forward*. La fase di amplificazione è stata seguita da una purificazione attraverso le colonnine Centri-Sep (Princeton Separazione, Freehold, New Jersey) e quantificazione con NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Il sequenziamento degli ampliconi stato eseguito mediante la piattaforma Roche 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX, seguendo le istruzioni del produttore (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT, USA). I campioni con diversi codici a barre sono stati raggruppati e sequenziati nella stessa corsia della PicoTiterPlate.

### **Pre-elaborazione dei dati di sequenziamento.**

Le letture ottenute dalla "corsa" di sequenziamento sono state prima separate, poi sono state rimosse le sequenze dei primer sia dal 5' che dal 3'. Le sequenze in cui non è stato identificato il primer 5' sono state scartate (sono stati ammessi 2 disallineamenti). Il filtraggio di qualità e il taglio sono stati effettuati con UPARSE [134]. Poi, le sequenze sono state assegnate a entità tassonomiche attraverso due diversi approcci:

1) in primo luogo, RDP MultiClassifier [135] è stato utilizzato per allineare le letture contro la banca dati RDP delle sequenze batteriche di rRNA 16S [136]. Una lettura è stata considerata

"classificata", quando la fiducia di assegnazione tassonomica a livello di genere era maggiore o uguale a 0,8.

2) Le letture rimanenti (assegnate con scarsa fiducia o per niente assegnate) sono state trattate con UPARSE come segue: sono state tagliate alla lunghezza fissa di 200 nucleotidi, mentre le letture più brevi sono state scartate (questo passaggio è necessario per evitare lacune terminali nella successiva fase di raggruppamento); i replicati sono stati rimossi assieme alle chimere, seguiti da una fase di raggruppamento con il 97% di identità di sequenza. Per ogni gruppo, che può essere considerato un'unità tassonomica operativa (OTU), è stata generata una sequenza consenso assemblando i suoi membri con Newbler (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT, USA). Infine, le sequenze consenso sono state allineate con il database con RDP RDP MultiClassifier, al fine di ottenere almeno una classificazione ad alto livello delle OTU generate.

Tutte le fasi per le quali non esistono metodi citati sono stati condotti per mezzo di script Perl sviluppati internamente.

### **Analisi dei dati.**

Sono stati rimossi OTU con conte molto basse in tutti i gruppi. Invece sono stati mantenuti solo OTU con più di 5 conte per milioni (cpm) in almeno un gruppo.

In seguito, quando vengono considerati i livelli tassonomici più elevati come i "phylum" o "genere", le conte da tutte le OTU assegnate sono riassunte a ciascun taxon.

Tutte le analisi sono state implementate in R.

### Diversità alfa e beta.

All'interno di ogni campione, le conte relative possono essere viste come una misura di abbondanza relativa di OTU e possono essere calcolate dividendo le conte  $k_{ij}$  di OTU  $i$  nel campione  $j$  dalle conte totali di quel campione  $K_j = \sum_i k_{ij}$ , come:

$$p_{ij} = \frac{k_{ij}}{K}$$

tale che  $\sum_i p_{ij} = 1$ .

La diversità Alpha dà una misura della "complessità compositiva" di una comunità batterica in un campione, aumentando con il numero di OTU presenti e con l'uniformità delle abbondanze relative  $p_{ij}$  [137]. Abbiamo misurato la diversità alfa con l'indice di diversità di primo ordine di Hill [138]:

$$D_j = \exp\left(-\sum_{i=1}^{S_j} p_{ij} \cdot \ln(p_{ij})\right)$$

dove  $S_j$  rappresenta il numero di OTU presenti nel campione  $j$ .

Come misura di uniformità, abbiamo considerato l'indice di Pielou [139]:

$$E_j = \frac{\ln(D_j)}{\ln(S_j)}$$

La diversità beta dà una misura, in termini di OTU comuni o uniche, di quanto diversi sono i campioni appartenenti allo stesso gruppo. Se due campioni hanno poche OTU uniche e hanno invece molte OTU in comune, allora la loro diversità beta è bassa. Abbiamo misurato la diversità beta per tutte le possibili coppie di campioni appartenenti allo stesso gruppo utilizzando l'indice di Whittaker [140]:

$$\beta_j = \frac{b + c}{2a + b + c}$$

dove, per ogni coppia, “a” rappresenta il numero di OTU comuni, mentre “b” e “c” rappresentano il numero di OTU che appartengono unicamente al campione 1 o al campione 2, rispettivamente.

Le differenze significative di alfa e beta diversità tra i gruppi sono state valutate con un *two-side t-test*, che impone un limite sul tasso di falsi (FDR) del 5% (correzione Benjamini-Hochberg per test multipli).

#### Analisi dei generi differenzialmente abbondanti.

Generi con differenze significative tra coppie di gruppi sono stati valutati con edgeR [141]. I dati delle conte sono stati aggregati a livello di genere e gli errori di composizione e di sequenziamento sono stati corretti con la media troncata dei valori M (TMM) di normalizzazione [141, 142]. I valori di  $p$  sono stati aggiustati per test multipli con la correzione Benjamini-Hochberg e i generi differenzialmente abbondanti sono stati selezionati con un livello di significatività del 5%.

#### **Analisi statistiche.**

Per evitare differenze tra osservatori, i casi sono stati codificati e l'analisi batterica dei campioni è stata eseguita senza la conoscenza dei dati clinici relativi al soggetto di appartenenza. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con test di Kruskal-Wallis per i dati clinici. Il test di Mann-Whitney U è stato effettuato dopo il test di Kruskal-Wallis, quando opportuno. Valori di  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## RISULTATI

### Soggetti.

Le caratteristiche dei soggetti inclusi nello studio sono presentate nella Tabella 21. Secondo le linee guida GOLD i pazienti BP1 e BP2 erano BPCO di stadio 3, mentre gli altri erano BPCO di stadio 2 [9]. Due soggetti con BPCO sono stati esclusi dalle successive analisi in quanto portatori di PPM: entrambi avevano > 50% delle sequenze appartenenti al genere *Pseudomonas*. In totale, sono state ottenute 201728 letture di sequenza, con una lunghezza media di lettura di 258 bp (media  $\pm$  deviazione standard,  $258 \pm 51$ ). Dopo il taglio delle sequenze di bassa qualità e la rimozione dei contaminanti sono state ottenute 161029 letture di sequenza (intervallo di lettura delle conte 3592-17701, media  $\pm$  deviazione standard: BPCO  $10064 \pm 4350$ : fumatori  $10353 \pm 4452$ ; non fumatori  $9560 \pm 1849$ ). I campioni dei BPCO, fumatori e non fumatori contenevano un totale di 27 diversi generi di batteri rappresentanti 6 diversi phyla batterici.

	<b>BPCO</b>	<b>Fumatori</b>	<b>Non fumatori</b>
<b>Soggetti n° (sesso)</b>	7 (6 M, 1 F)	7 (4 M, 3 F)	4 (2 M, 2 F)
<b>Età (anni)</b>	$73 \pm 4$ **	$62 \pm 8$	$65.5 \pm 10.7$
<b>FEV1 (%)</b>	$60.0 \pm 23.7$ *	$83.9 \pm 18.1$	$104.4 \pm 15.1$
<b>FEV1/FVC (% post BD)</b>	$57.1 \pm 9.3$ ▼	$81.2 \pm 7.0$	$77.6 \pm 6.9$
<b>Pack-years (n°)</b>	$50 \pm 42.5$	$41.0 \pm 28.8$	-
<b>BMI</b>	$25.7 \pm 4.7$	$25.0 \pm 9.3$	$25.7 \pm 6.9$
<b>Bronchite cronica (n°/tot)</b>	3/7	-	-
<b>Corticosteroidi inalatori (n°/tot)</b>	3/7	-	-

**Tabella 21.** Caratteristiche dei partecipanti all'analisi della colonizzazione microbica. I dati sono presentati come mediana  $\pm$  IQR. \*  $p < 0.05$  vs non fumatori; \*\*  $p < 0.01$  vs non fumatori; ▼  $p < 0.05$  vs fumatori e vs non fumatori.

Analizzando i campioni con il tradizionale metodo colturale non sempre è stato possibile identificare e caratterizzare le singole colonie perché nella maggior parte dei casi si trattava di flora mista. Solo in sette casi si è isolato uno o più batteri potenzialmente patogeni (Tab. 22).

<b>Sogg</b>	<b>Esame microscopico</b>	<b>Esame colturale</b>
b 3	Diplococchi G+	<b>Streptococcus</b>
b 4	Cocchi G+/-	<b>Pseudomonas</b>
b 5	G+/-	Pseudomonas
f 3	Cocchi G+/-	Escherichia Sphingomonas
f 4	Cocchi G+/-	Staphilococcus
s 2	Bastoncini G+/-	<b>Prevotella</b>
s 3	G+/-	<b>Prevotella</b>

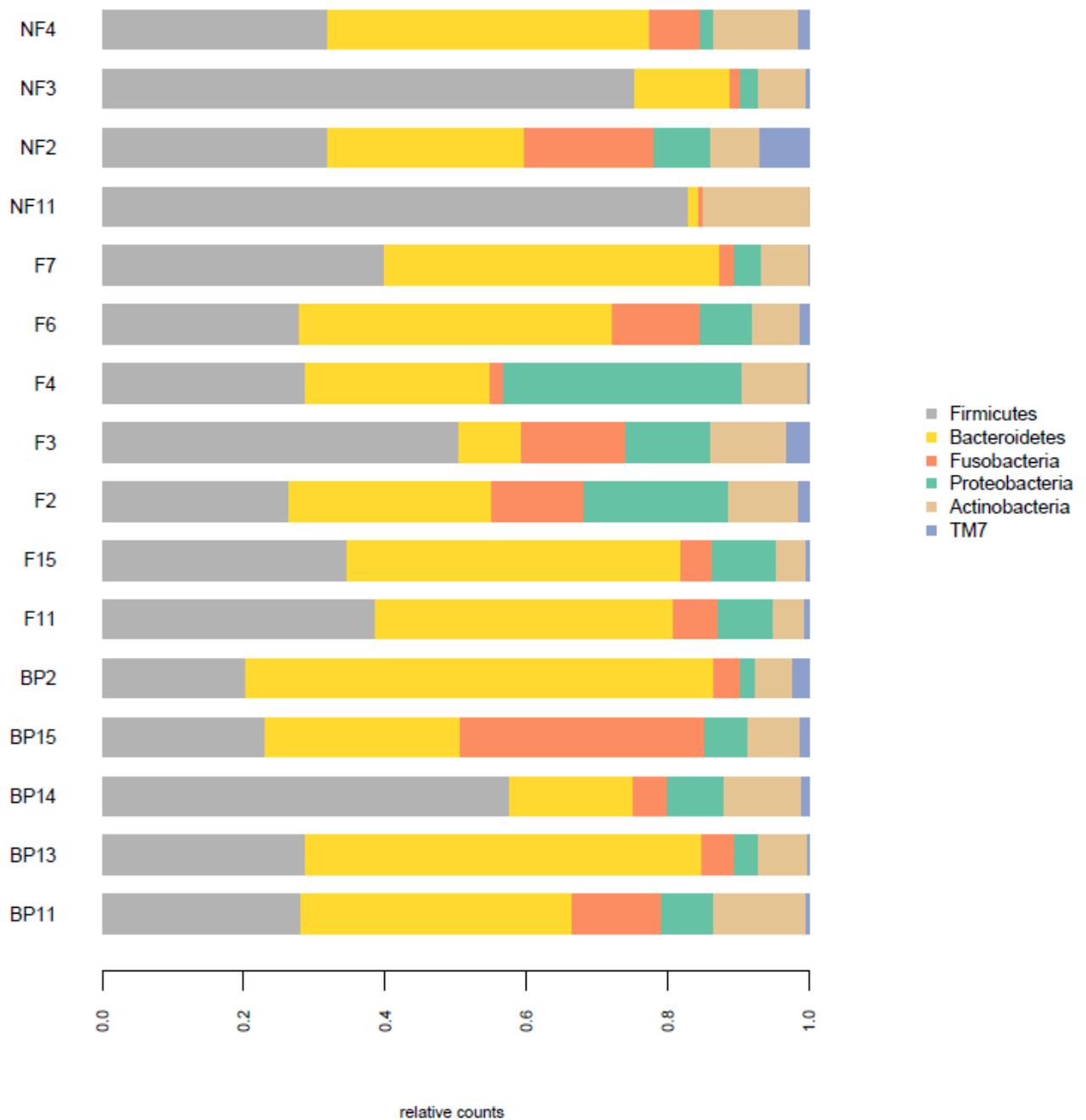
**Tabella 22.** Risultati dell'analisi microscopica e colturale dei campioni di espettorato indotto (b: BPCO; f: fumatori; s: non fumatori sani).

Per i batteri isolati con le tecniche colturali è stato fatto l'antibiogramma ed è risultato in tutti i casi che si trattava di batteri sensibili a tutte le molecole testate, quindi non erano particolarmente patogeni, ma piuttosto riconducibili alla normale flora.

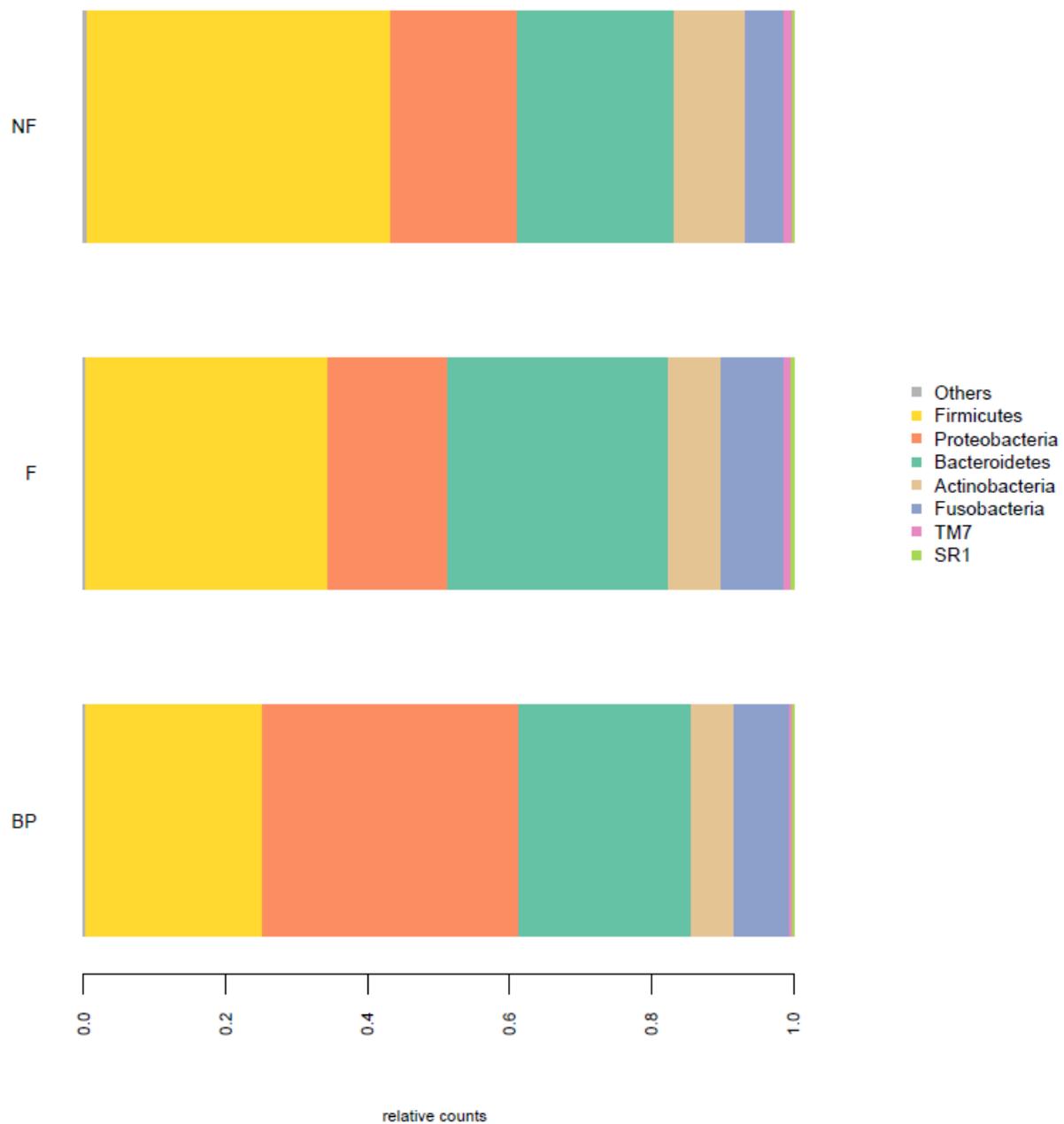
### **Identificazione dei phyla delle comunità batteriche.**

Mediante NGS nei campioni sono stati identificati sei phyla batterici : Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobatteri, Actinobacteria e TM7. I phyla Firmicutes e Bacteroidetes sono stati osservati essere molto abbondanti tra tutti i soggetti (Figura 29).

La maggior parte dei batteri nei soggetti con BPCO apparteneva a Bacteroidetes (41.4%), con una abbondanza relativa superiore nei fumatori (35.1%) e non fumatori (24.2%) (Figura 30). Nei fumatori l'abbondanza dei Firmicutes era pari a quella dei Bacteroidetes (35.1%). I fumatori avevano più batteri appartenenti al phylum Proteobacteria (13.7%) rispetto ai soggetti con BPCO (5.4%) e non-fumatori (2.8%). Nei soggetti con BPCO, fumatori e non fumatori i Fusobatteri rappresentavano rispettivamente il 12%, 7.8% e 6.2% della comunità batterica,. La maggior parte dei batteri nei soggetti sani apparteneva ai Firmicutes (54.7%). Nei 3 gruppi di soggetti, i batteri del phyla Actinomices e TM7 rappresentavano solo una piccola parte del microbioma.



**Figura 29.** Conteggi relativi a livello di phylum. Istogrammi dei conteggi relativi riportati per campioni singoli dei soggetti con BPCO (BP), fumatori (F) e non fumatori (NF).



**Figura 30.** Conteggi relativi a livello di phylum. Istogrammi dei conteggi relativi riportati per gruppo di soggetti: BPCO (BP), fumatori (F) e non fumatori (NF).

### **Identificazione dei generi delle comunità batteriche.**

Nei campioni dei soggetti esaminati sono stati osservati 27 generi: *Actinomyces*, *atopobium*, *Bergeyella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Catonella*, *Dialister*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Lachnospiracea*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Megasphaera*, *Moryella*, *Neisseria*, *Oribacterium*, *Parivimonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Rothia*, *Selenomonas*, *TM7* e *Veillonella* (Figura 31).

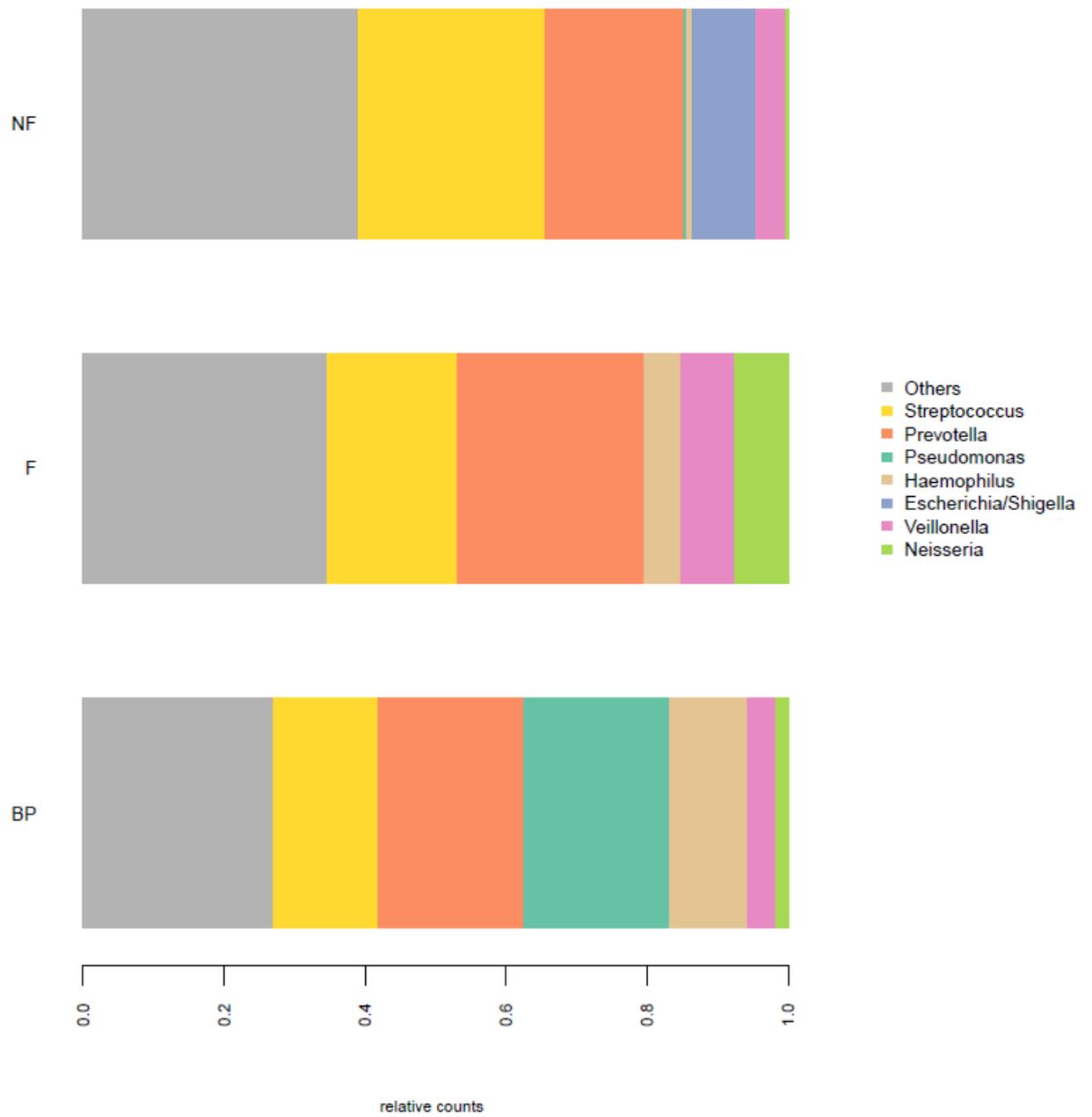
La maggior parte delle sequenze nei BPCO e fumatori sono stati identificate come appartenenti al genere *Prevotella* (37.9% e 32.8% rispettivamente) (Figura 32), mentre nei controlli sani il genere più abbondante era *Streptococcus* (42.1%). *Neisseria* (8.1%) era ampiamente presente nel gruppo dei fumatori, ma quasi assente nel gruppo BPCO (0.9%) e nel gruppo dei non fumatori sani (0.4%). I pazienti BP1, BP3 e BP4 erano in trattamento con corticosteroidi per via inalatoria. È interessante notare che essi avevano il 23.5% e il 7.9% delle sequenze appartenenti ai generi *Prevotella* e *Veillonella*. D'altra parte, i BPCO non trattati (BP2 e BP5) avevano il 59.0% e il 3.6% delle sequenze appartenenti ai generi *Prevotella* e *Veillonella* rispettivamente.

I generi *Neisseria* (0.08 numero di conteggi per milione (cpm)) e *Bergeyella* (0.0009 cpm) erano prevalenti nei fumatori (Figura 33). Il numero di cpm di *Neisseria* era 10 volte superiore nei fumatori rispetto ai BPCO. Il genere *Bergeyella* era assente nei non fumatori. In particolare, le *reading* rappresentanti il genere *Bergeyella* appartenevano ad un gruppo di sequenze che inizialmente non era stato classificato; la sequenza consenso del gruppo è stata assegnata a *Bergeyella* con una confidenza pari a 0.76. I generi *Streptococcus* e *Rothia* erano prevalenti nel gruppo dei non fumatori: avevano in media, 0.42 e 0.05 cpm rispettivamente (Figura 34).

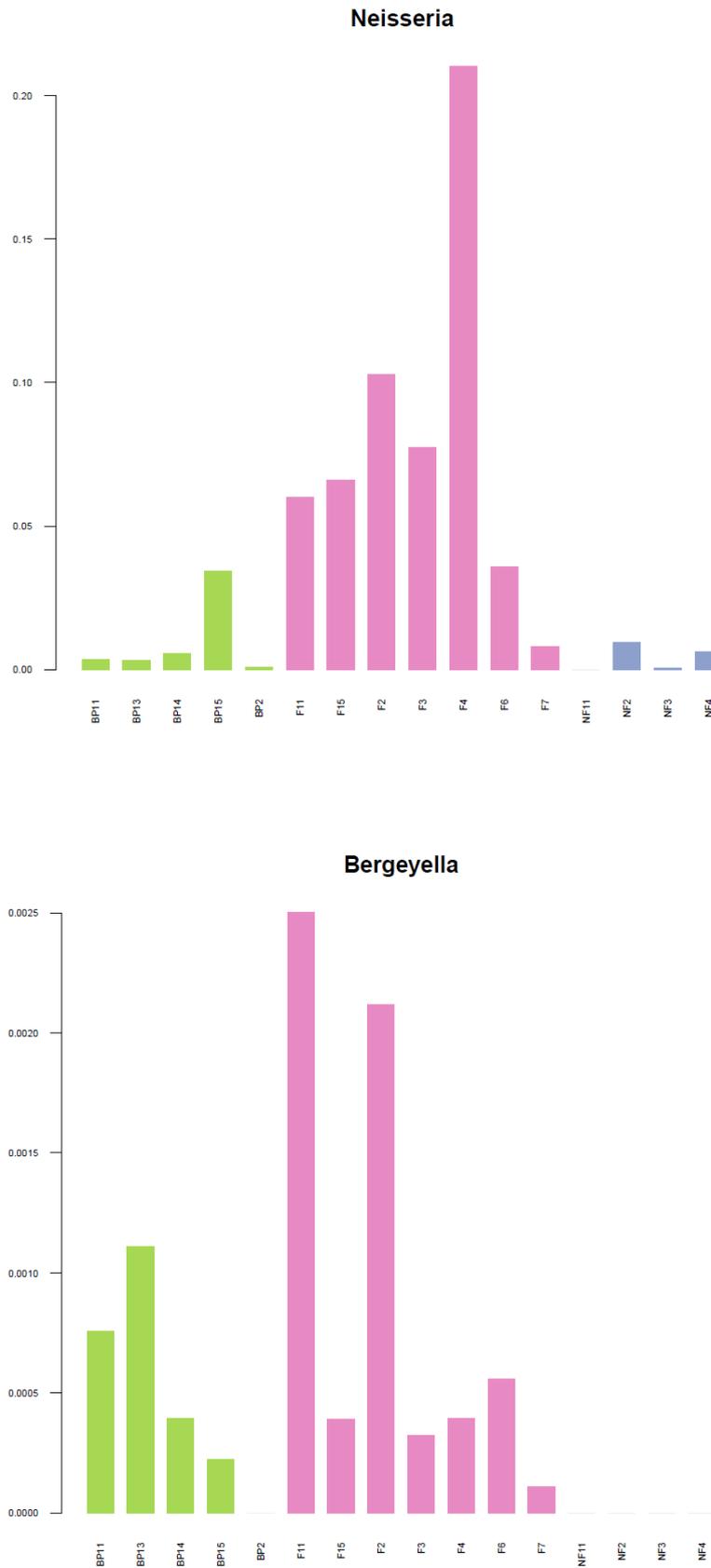
Le abbondanze di quattro generi erano significativamente diverse nel confronto a coppie con edgeR. *Neisseria* era più abbondante nei fumatori sani rispetto ai non fumatori sani ( $p = 1.55e-02$ ) o pazienti con BPCO ( $p = 1.05e-03$ ). *Bergeyella* risultava più abbondante nei pazienti con BPCO rispetto ai non fumatori sani ( $p = 2.91e-02$ ). *Streptococcus* era più abbondante nei non fumatori sani che nei fumatori sani ( $p = 4.98e-02$ ) o pazienti con BPCO ( $p = 1.06e-02$ ). *Rothia* era più abbondante nei non fumatori sani che nei pazienti con BPCO ( $p = 3.3e-02$ ).



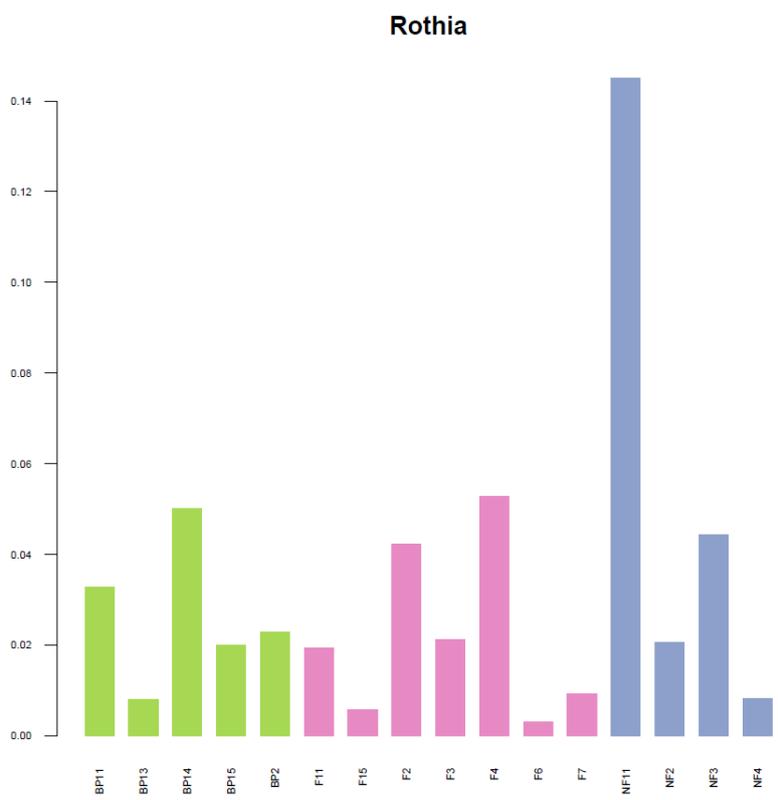
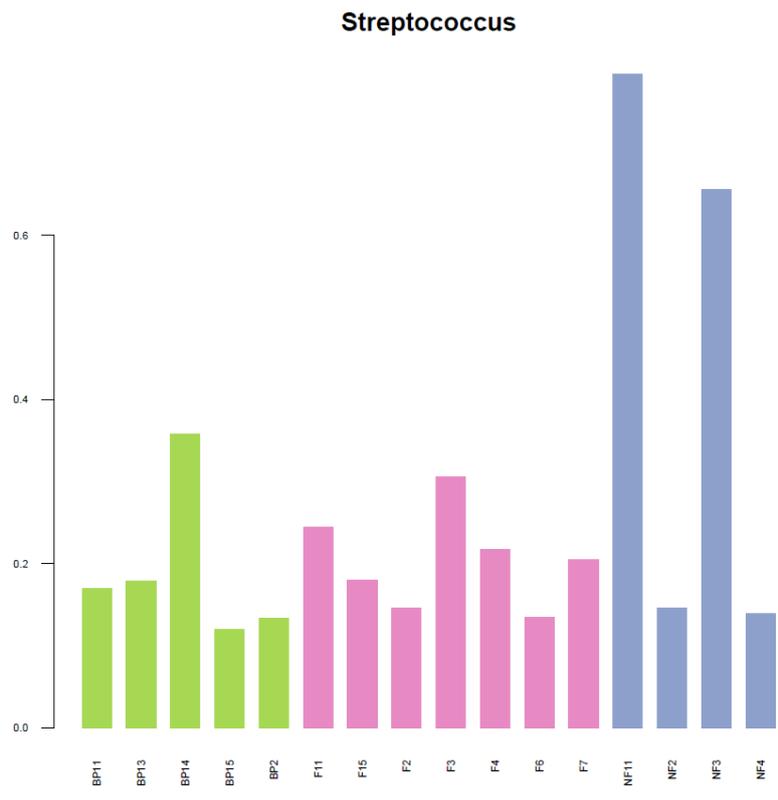
**Figura 31.** Conteggi relativi a livello di genere. Istogrammi dei conteggi relativi riportati per campioni singoli dei soggetti con BPCO (BP), fumatori (F) e non fumatori (NF).



**Figura 32.** Conteggi relativi a livello di genere. Istogrammi dei conteggi relativi riportati per gruppo di soggetti: BPCO (BP), fumatori (F) e non fumatori (NF).



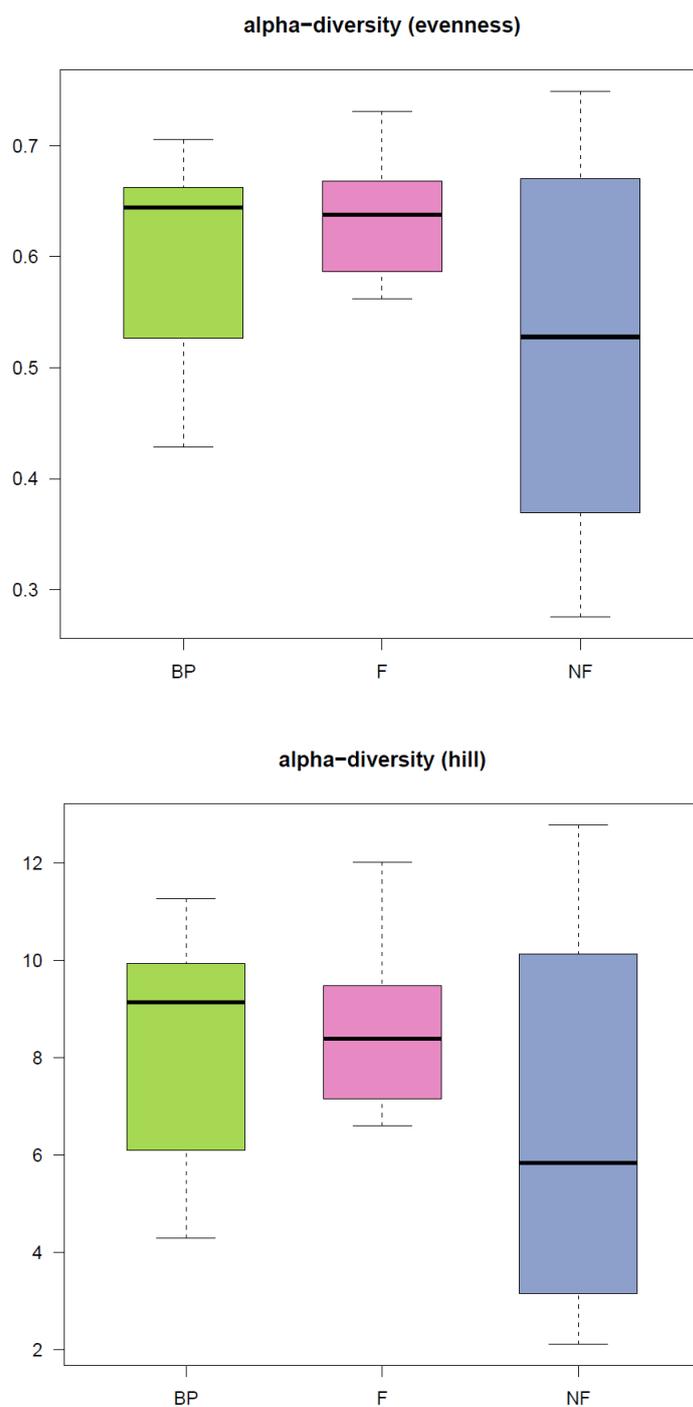
**Figura 33.** Generi differenzialmente abbondanti. Barplots di abbondanze relative di *Neisseria* e *Bergeyella*. BP = soggetti con BPCO (verde); F = fumatori (rosa); NF = non fumatori (celeste).



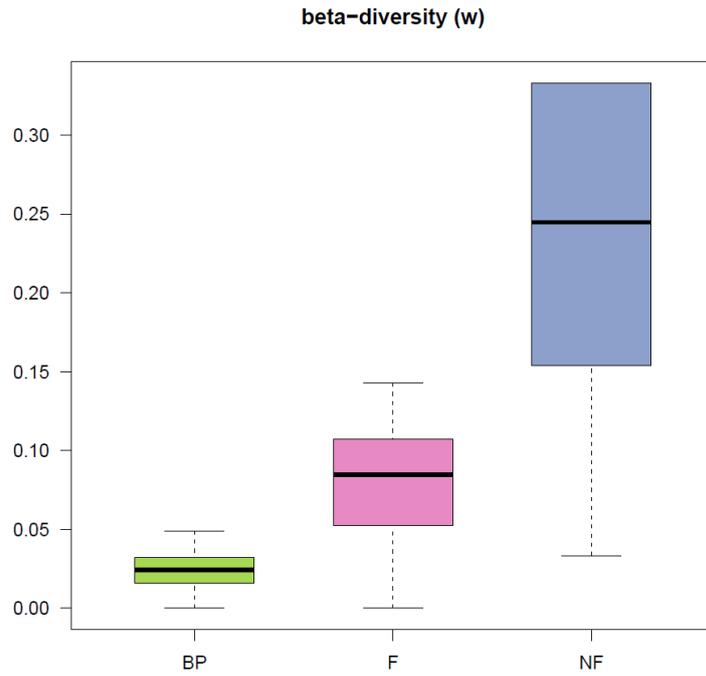
**Figura 34.** Generi differenzialmente abbondanti. Barplots di abbondanze relative di *Streptococcus* e *Rothia*. BP = soggetti con BPCO (verde); F = fumatori (rosa); NF = non fumatori (celeste).

### Diversità $\alpha$ e $\beta$ .

La diversità alpha e l'uniformità (Figura 35) non sono significativamente diverse tra i gruppi (*two way t-test*, valori di p corretti per test multipli sempre  $> 0.5$ ). Al contrario, la diversità beta (Figura 36) è significativamente diversa tra tutte le coppie di gruppi (*two way t-test*, valori di p corretti per test multipli sempre  $< 0.04$ ).



**Figura 35.** Grafici a scatole dell'indice di diversità alpha Evenness (sopra) e Hill (sotto). BP = soggetti con BPCO (verde); F = fumatori (rosa); NF = non fumatori (celeste).



**Figura 36.** Grafico a scatole dell'indice di diversità beta di Whittaker, calcolato per tutti i gruppi. BP = soggetti con BPCO (verde); F = fumatori (rosa); NF = non fumatori (celeste).

## DISCUSSIONE

Questo studio di NGS fornisce nuove informazioni sul microbiota residente nell'espettorato indotto di pazienti con BPCO stabile rispetto ai fumatori senza BPCO e ai soggetti non fumatori.

Dal presente studio emerge come i tradizionali metodi colturali siano adattati per isolare i comuni batteri patogeni e non per valutare la diversità microbica. Come dimostrato da Charlson et al. [133], il tratto respiratorio inferiore contiene una carica batterica più bassa rispetto a quello superiore quindi sono necessarie tecniche di biologia molecolare molto fini. La coltura tradizionale è incompleta, altamente selettiva, e semi-quantitativa. Gli studi coltura dipendenti sono tendenzialmente ristretti all'individuazione di batteri aerobi, quindi precedentemente non è stato adeguatamente studiato il contributo dei *lineage* anaerobi alla composizione della comunità microbica residente. Al contrario, l'analisi molecolare caratterizza intere popolazioni e, pur non essendo completamente imparziali nell'estrazione del DNA o nell'efficienza di amplificazione, può definire con precisione le abbondanze relative di tutte le comunità distinte di batteri. Così, la caratterizzazione molecolare consente di confrontare nicchie diverse e identificare organismi più abbondanti presenti in un sito rispetto ad un altro, senza bisogno di una conoscenza a priori degli organismi possibilmente presenti [120].

L'espettorato indotto è stato utilizzato per la valutazione del microbioma bronchiale in quanto questo campione è facilmente accessibile, di ottenimento non invasivo e quindi particolarmente adatto quando si studiano volontari sani. Alcuni autori hanno ipotizzato che il microbioma polmone potrebbe riflettere una microaspirazione della flora orale [14]. Tuttavia, Rogers e colleghi hanno dimostrato con tecniche di *profiling* molecolare, che i campioni di espettorato rispetto ai lavaggi orali di pazienti con fibrosi cistica non sono soggetti a contaminazione [143]. Charlson et al. [133] hanno analizzato il microbiota polmonare in sei soggetti sani confrontando campioni in diversi siti: tampone orofaringeo, nasofaringeo, BAL e brushing delle vie respiratorie inferiori. I batteri nei polmoni sembrano essere gli stessi di quelli nelle vie aeree superiori. Tuttavia, Erb-Downward et al. [127] sostengono che la microflora del BAL non sia contaminata da secrezioni delle vie aeree superiori, perché è simile a quella degli espianti. Quattro tipi di campioni respiratori (spato, aspirato bronchiale, BAL e mucosa bronchiale) sono stati studiati nei pazienti con BPCO da Cabrera-Rubio et al. [128]. I loro risultati suggeriscono la presenza di diversi microbiota nei compartimenti superiori e inferiori del polmone. Tuttavia, Millares et al. [130] considerano l'espettorato come un campione rappresentativo per studiare il microbioma delle secrezioni bronchiali nei pazienti con BPCO, con l'ulteriore vantaggio che i risultati ottenuti possono essere facilmente correlati con la cultura dell'espettorato.

La composizione in phyla nei pazienti BPCO stabili osservata nel presente studio è simile a quella delle ricerche precedenti in soggetti BPCO, fumatori e controlli sani basate sull'utilizzo di brushing bronchiale e BAL [127, 133] con il vantaggio che il numero di letture di sequenza da noi ottenuto è molto più alto di quelli precedentemente analizzati [128-131]. I phyla dominanti nei polmoni dei pazienti con BPCO sono risultati essere Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria come riportato in letteratura [128-131]. Inoltre, è stato riconosciuto il phylum dei Fusobatteri, come in due precedenti lavori [130, 131], e il phylum TM7 come nel lavoro di Garcia-Nunez et al. [131].

Si sono dovuti escludere 2 pazienti per il rilevamento di oltre il 50% delle sequenze appartenenti al genere *Pseudomonas*. Infatti, i pazienti con BPCO possono essere spesso infettati con un clone *Pseudomonas* che rimane nei polmoni per anni, senza evidenze cliniche e con trasmissione inter-paziente [454].

Un importante genere batterico colonizzatore in tutti i soggetti analizzati è risultato essere *Prevotella*, ovvero batteri anaerobi Gram negativi riconosciuti come parte della normale flora orale e vaginale ed isolati da infezioni del tratto respiratorio. Hilty et al. [145] e Bittar et al. [146] suggeriscono che i generi *Prevotella* e *Veillonella* sono elementi distintivi della normale flora di epitelii polmonari e la loro presenza nelle vie aeree può non essere stata generalmente riconosciuta poichè richiedono condizioni di coltura anaerobie. Inoltre *Prevotella* potrebbe inibire direttamente la crescita di altri batteri.

Si è inoltre osservato che i soggetti con BPCO che ricevevano corticosteroidi mostravano una scarsa abbondanza di batteri di genere *Prevotella* e un'abbondanza maggiore di batteri di genere *Veillonella* rispetto a soggetti non trattati. I corticosteroidi sono noti per ridurre la risposta immunitaria innata e polmonare, in particolare attraverso un'azione inibitoria sulle funzioni dei macrofagi, una diminuzione della produzione di citochine o espressione di ossido nitrico sintasi [147]. Pertanto non si può escludere la possibilità che le differenze osservate siano da attribuire alla terapia che i pazienti ricevevano piuttosto che al loro stato di malattia [148]. Ciò è stato confermato da uno studio più ampio con analisi di campioni di BAL di BPCO moderata o grave che usavano corticosteroidi e broncodilatatori per via inalatoria [149].

Secondo la nostra analisi, i fumatori rispetto ai non fumatori hanno un numero relativo aumentato dei generi *Neisseria* e *Bergeyella*, mentre è diminuito per i generi di *Streptococcus* e *Rothia*. Altri studi riportano nei fumatori una diminuita abbondanza di *Neisseria* rispetto ai BPCO ma considerano campioni orofaringei [150, 151]. D'altra parte, il fumo attivo e l'esposizione al fumo passivo sono anche associati al trasporto di alcuni PPM, quali *Neisseria*. I componenti del fumo possono alterare la carica batterica o le proprietà della superficie delle cellule epiteliali. Il

rivestimento passivo di superfici mucose con i componenti del fumo di sigaretta potrebbe aumentare il legame di batteri potenzialmente patogeni [14]. Inoltre il fumo e l'esposizione passiva al fumo di sigaretta possono essere associati con la malattia meningococcica invasiva [152].

Nei fumatori, ma non nei controlli sani, si è trovato il genere *Bergeyella*, composto da batteri aerobi Gram negativi. Nei soggetti con BPCO si sono rilevati livelli molto bassi di *Bergeyella*, motivo per cui probabilmente i lavori precedenti trascuravano la presenza di questo genere. Dalla letteratura corrente l'habitat ecologico di *Bergeyella* sembra essere legato all'ambiente orale, indipendentemente dall'ospite [153]. È stato dimostrato che l'assunzione di *Lactobacillus reuteri* correla con l'aumento di *Bergeyella* HOT322 [157]. Purtroppo non abbiamo informazioni se alcuni dei nostri pazienti avevano assunto probiotici.

Per quanto riguarda i generi *Streptococcus* e *Rothia*, erano prevalenti nel gruppo dei non fumatori. La maggior parte degli studi effettuati sull'espettorato [128, 130, 131] riconoscono *Streptococcus* nei campioni dei BPCO, ma nel presente studio si sono osservati quasi gli stessi livelli di *Streptococcus* nei fumatori e un'alta prevalenza nei non-fumatori. I nostri risultati concordano con quelli di Park e collaboratori in tamponi orofaringei: nei soggetti sani la maggior parte delle sequenze appartenevano a *Streptococcus spp.* [150]. In realtà il numero di infezioni da *Rothia mucilaginosa* è ancora sottovalutata a causa della poca resa della crescita batterica o anche per l'identificazione microbiologica non corretta a causa della sua alta somiglianza con altri cocchi Gram-positivi, come ad esempio lo *Streptococcus spp.*, stafilococchi coagulasi-negativi e *Enterococcus spp* [154]. *Rothia* fa parte della normale flora del cavo orale e delle vie respiratorie superiori, ma può rappresentare anche un importante agente infettivo endogeno nella polmonite acquisita in comunità. *Rothia* è un genere già riconosciuto in precedenza nei campioni di BPCO [130, 131], ma in questo studio si sono rilevati livelli simili anche in soggetti sani fumatori e non fumatori, con un caso di un soggetto non-fumatore con una grande abbondanza di questo genere (14%).

I risultati ottenuti hanno indicato una significativa differenza statistica della diversità nel microbioma tra i soggetti con BPCO, fumatori e non fumatori. I soggetti sani hanno massima diversità  $\beta$ : i loro campioni hanno tipo di sequenze ben diverse, mentre la varietà di specie è progressivamente ridotta nei fumatori e nei fumatori con BPCO. Questi risultati suggeriscono che il fumo di sigaretta possa indurre una diminuzione nell'abbondanza relativa della specie indipendentemente dallo sviluppo della limitazione al flusso aereo cronica, influenzando così la composizione del microbioma polmonare. I nostri risultati sono in accordo con quelli di Erb-Dawnward et al. [127] ottenuti in campioni polmonari. Nel tratto respiratorio, come in altri siti della mucosa, un microbiota diversificato può essere importante per la salute, per la resistenza alla

colonizzazione, per l'integrità epiteliale e per l'immuno-regolazione. Una comunità disbiotica indotta dal fumo di sigaretta potrebbe essere uno dei fattori che facilitano una risposta infiammatoria anomala nei polmoni osservata nei pazienti con BPCO [155]. Vi sono prove che l'aumento in gravità della BPCO sia accompagnata da una diminuzione della diversità del microbioma bronchiale, con una perdita di parte della flora residente che è sostituita da un microbiota più ristretto che comprende PPM [130]. Sarebbero necessari studi prospettici con grandi gruppi di soggetti per verificare se questa relativa riduzione della diversità sia persistente.

Anche se la sequenza 16S rRNA attraverso le tecnologie di NGS fornisce uno strumento senza precedenti per rivelare la composizione del microbioma e la dinamica, ci sono alcune questioni che devono essere affrontate al fine di raggiungere una completa comprensione del suo ruolo. Prima di tutto è essenziale la scelta dei primer PCR, dal momento che diversi set di primer possono selezionare o escludere alcune specie di batteri [156, 157]. I set di primer disponibili dovrebbero essere costantemente aggiornati per tenere il passo con la scoperta di nuove specie e con l'aumento della variabilità di sequenza nelle banche dati specializzate. Inoltre, pregiudizi nella quantificazione delle specie possono derivare dal numero dispari di copie del gene 16S rRNA in diversi microbi, che può variare da uno a quindici [158]. Inoltre, le informazioni fornite dal sequenziamento genico mirato sono utili solo per una classificazione dei diversi taxa presenti in un campione. Metodi più completi, come ad esempio l'intero sequenziamento del genoma, sarebbero più appropriati per rivelare il potenziale funzionale di una comunità batterica. Infatti, due specie con identiche sequenze 16S potrebbero differire in molte altre regioni genomiche, tra cui geni coinvolti nella tossicità o patogenicità [159]. Infine, il limite principale di tutti i metodi che si basano solo sui dati genomici è probabilmente l'impossibilità di stabilire una vera causalità. Ulteriori studi sono necessari per completare tali informazioni, sulla base di metodi che sono in grado di guardare la parte attiva del microbioma, come ad esempio metatranscriptomica, metaproteomica e metabolomica.

Allo stato attuale, non si sa se possano contribuire alla patogenesi della BPCO anche i microbi non batterici, ovvero i microbiomi virali e dei funghi [160].

Gli sforzi orientati alla prevenzione della BPCO dovrebbero essere indirizzati verso il mantenimento di un microbioma diversificato (ad esempio, con una bassa esposizione agli antibiotici). Secondo Segal et al. [160], le terapie per differenziare il microbiota potrebbero variare da quelle volte a eliminare singoli ceppi di una singola specie (ad esempio, vaccini coniugati antibatterici) a quelle volte a sostituire l'intera comunità con un nuovo microbiota delle vie aeree intatto (simile all'uso del trapianto fecale in casi di colite da *C. difficile*). Il rapporto ospite-patogeno nella BPCO è un processo complesso e dinamico caratterizzato da frequenti cambiamenti di agenti

patogeni, di ceppi e di carica, e di successive risposte immunitarie dell'ospite e ulteriori studi sull'ecologia microbica del polmone ci aiuteranno a capire meglio la progressione della BPCO e il ruolo del fumo.



## **PARTE IV**

### **Invecchiamento polmonare dovuto ad inquinamento urbano e a fumo di sigaretta.**

#### **INTRODUZIONE**

I telomeri sono sequenze ripetitive di nucleotidi (TTAGGG)<sub>n</sub> posizionate alla fine dei cromosomi che proteggono le estremità dalla degradazione nucleolitica e mantengono l'integrità strutturale dei cromosomi [161]. I telomeri sono comunemente considerati come l'orologio biologico interno di un organismo vivente, poiché la loro lunghezza si riduce con l'età in tutte le cellule somatiche replicanti che sono state esaminate [162]. Si presume che telomeri molto corti abbiano implicazioni funzionali, come l'induzione di senescenza cellulare, che è caratterizzata dall'espressione di marcatori specifici dell'invecchiamento e dall'incapacità delle cellule di dividersi ulteriormente. Le caratteristiche dell'invecchiamento biologico variano considerevolmente tra gli individui, e tali differenze possono riflettere una serie di fattori ambientali che influenzano lo stress ossidativo e l'infiammazione e, di conseguenza, accelerare l'accorciamento dei telomeri [163]. Negli studi con soggetti umani, la lunghezza dei telomeri misurata nel DNA dei leucociti diminuisce con l'età, e l'accorciamento dei telomeri nei leucociti del sangue è stato mostrato essere accelerato da fattori ambientali che aumentano l'invecchiamento biologico, come il fumo [164] e lo stress ossidativo [165]. Come riportato anche da Hoxa e colleghi [166], numerose indagini epidemiologiche hanno dimostrato che gli individui con i telomeri dei leucociti circolanti più corti hanno un'aspettativa di vita diminuita e un aumentato rischio di infarto miocardico, di grave malattia coronarica, di insufficienza cardiaca, di ipertensione, di ictus e di cancro [166].

In diversi studi epidemiologici l'inquinamento da emissioni del traffico è stato correlato a morbilità e mortalità prematura da malattie cardiovascolari e tumori. L'esposizione a sostanze inquinanti del traffico è stato collegato all'attivazione di processi biologici, come la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e all'attivazione di vie infiammatorie, che possono accelerare l'accorciamento dei telomeri [167].

Recentemente alcune ricerche hanno valutato la relazione tra esposizione a PM e lunghezza dei telomeri [168-170]. Questi studi però sono stati eseguiti secondo un disegno *cross-sectional*, la stima dell'esposizione cumulativa personale a PM era basata su misurazioni esterne e la lunghezza dei telomeri era stata analizzata solo nei leucociti del sangue periferico, ma non in cellule dell'organo bersaglio, come il polmone. Inoltre nessuno studio finora ha esaminato se l'esposizione a inquinamento da traffico sia correlata con l'accorciamento dei telomeri in cellule dell'IS.

## **OBBIETTIVO**

Questo studio è volto a indagare se l'esposizione a inquinamento urbano e a fumo di sigaretta nei campioni di sangue possa accelerare l'invecchiamento polmonare ed a confrontare questi risultati con quelli ottenuti nei campioni di espettorato indotto degli stessi soggetti. Inoltre si confronteranno soggetti sani con fumatori e BPCO fumatori.

## **MATERIALI E METODI**

### *Estrazione e quantificazione del DNA.*

Per l'estrazione e quantificazione del DNA dalle cellule dell'espettorato indotto un'aliquota di sospensione cellulare precedentemente stoccata a  $-80^{\circ}\text{C}$  viene scongelata. Successivamente viene centrifugata a  $4^{\circ}\text{C}$  per 15 min a 4000RPM, si versa lentamente il surnatante in un'altra falcon e si ricentrifuga il tutto ancora a  $4^{\circ}\text{C}$  per 15 min a 4000 RPM. I due pellet vengono quindi risospesi in 300  $\mu\text{l}$  di Nuclei Lysis Solution (kit Wizard Genomic DNA purification, Promega, WI, USA). La soluzione dovrebbe diventare molto viscosa, se gruppi di cellule sono visibili dopo la miscelazione, la soluzione viene incubata a  $37^{\circ}\text{C}$  fino a quando le macchie scompaiono. Se le macchie sono ancora visibili dopo 1 ora, si aggiunge dell'ulteriore Nuclei Lysis Solution (100 $\mu\text{l}$  per un campione di 300 $\mu\text{l}$ ) e si ripete l'incubazione. Successivamente si aggiungono 1.5 $\mu\text{l}$  di RNase Solution al lisato nucleare e si mescola il campione capovolgendo la provetta 2-5 volte. Si mette ad incubare il tutto a  $37^{\circ}\text{C}$  per 15 min e poi si raffredda a temperatura ambiente. Si aggiunge la Protein Precipitation Solution (100 $\mu\text{l}$  per un campione di 300 $\mu\text{l}$ ) al lisato nucleare, e si mescola con il vortex vigorosamente per 10-20 secondi. Dopo aver centrifugato a 13,000-16,000 g per 3 min a temperatura ambiente, dovrebbe essere visibile un pellet marrone scuro. A questo punto si trasferisce il surnatante in una provetta da 1,5 ml contenente 300 $\mu\text{l}$  di isopropanolo a temperatura ambiente. La soluzione viene mescolata delicatamente per inversione fino a quando i filamenti bianchi di DNA formano una massa visibile. Si centrifuga a 13,000-16,000 g per 1 min a temperatura ambiente. Il DNA risulta visibile come una piccola pallina bianca. Si lascia decantare il surnatante e si aggiunge al DNA etanolo al 70% a temperatura ambiente per lo stesso volume del campione. La provetta viene delicatamente capovolta per diverse volte al fine di lavare il pellet di DNA ed i lati della provetta. Si centrifuga come prima e si aspira accuratamente l'etanolo utilizzando una pipetta Pasteur. Il pellet di DNA è molto sciolto a questo punto e si deve evitare di aspirare il pellet nella pipetta. Una volta capovolta la provetta sulla carta assorbente pulita si lascia asciugare il pellet per 10-15 minuti. Viene aggiunta nella provetta la DNA rehydration Solution

(100µl per un campione di 300µl) e il DNA viene incubato a 65° C per 1 ora. Periodicamente si miscela la soluzione picchiando delicatamente il tubo. Il DNA può quindi essere conservato a 2-8° C.

#### *Real-time PCR.*

La lunghezza dei telomeri viene misurata nel DNA dei leucociti provenienti da sangue periferico e dei campioni di espettorato indotto con il metodo della real-time PCR quantitativa sviluppato da Cawthon [171].

Questo metodo misura la lunghezza relativa dei telomeri nel DNA genomico determinando il rapporto (T: S ratio) del numero di copie ripetute di telomeri (T) sul numero di geni a singola copia (S) in campioni sperimentali relativi a un campione di riferimento. Il gene a singola copia usato in questo studio è la β-globina umana (HGB). Viene generata una curva standard a otto punti da un pool di DNA diluito serialmente (ottenuto da 20 campioni di DNA scelti in modo casuale tra i campioni analizzati nel presente studio), che vanno 30-0,234 ng in ogni piatto, in modo che da questa possa essere determinata la relativa quantità di T e S (in nanogrammi). Tutti i campioni e gli standard sono eseguiti in triplicato e la media delle misure del rapporto di 3 T/S sarà utilizzata nelle analisi statistiche. Le corse di PCR sono condotte in triplice copia mediante il 7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Il profilo dei cicli termici di entrambi gli ampliconi inizia con un'incubazione per 3 min a 95° C per attivare la hot-start Taq DNA polimerasi. Le condizioni di PCR per i telomeri sono 25 cicli a 95° C per 15 s e 54° C per 60 s. Le condizioni di PCR per HGB sono 35 cicli a 95° C per 15 s, 58° C per 1 s e 72° C per 15 s.

#### *Analisi statistica*

Tutti i casi saranno codificati e l'analisi di tutti i campioni verrà condotta senza essere a conoscenza dei dati clinici e funzionali dei soggetti a cui appartengono. Tutti i risultati saranno raccolti in un database e le differenze tra i gruppi di soggetti esaminati saranno valutate utilizzando test statistici parametrici (per le caratteristiche cliniche) e non parametrici (per le caratteristiche morfometriche). Tra quest'ultimi si impiegherà il test di Kruskal-Wallis per valutare le differenze tra le mediane dei tre gruppi. Nei casi in cui questo risulti significativo, per confrontarne i gruppi a due a due si applicherà il test di Mann-Whitney. Per studiare le correlazioni invece sarà usato il coefficiente di correlazione di Pearson. Verranno impiegati i software statistici Satview, Statgraphic, Minitab, R e NPC test.

## **RISULTATI**

Il progetto dello studio, il protocollo seguito e i moduli forniti ai partecipanti (informativa sul trattamento dei dati personali, modulo del consenso informato e questionario) sono stati sottoposti all'attenzione del Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova, che "ha espresso all'unanimità parere favorevole allo studio in oggetto", tuttavia l'approvazione ha richiesto tempi maggiori di quelli previsti in quanto la domanda presentata ha avuto riscontro solo a Settembre. Per l'analisi dell'accorciamento dei telomeri si attende di aver terminato la raccolta dei campioni, al fine di eseguire in un'unica seduta le analisi.

Tutti i partecipanti quindi approveranno un'eventuale pubblicazione dei dati ottenuti al termine del progetto di studio, in caso di esito rilevante, mediante l'utilizzo di opportuni codici identificativi ad essi assegnati.

### **Estrazione di DNA da espettorato indotto.**

È stata messa a punto la metodica di estrazione del DNA per "*salting out*" applicata a campioni di espettorato indotto, in cui è presente il DTT (ditiotreitolo) come agente mucolitico.

Sono state scongelate 2 aliquote di espettorato di uno stesso soggetto:

- aliquota a) 500 µl
- aliquota b) 300 µl .

Dopo aver aggiunto il mucolitico e aver accuratamente sciacquato i campioni in PBS, per ciascuna aliquota si è separato il surnatante dal pellet cellulare. A questo punto il bottone del campione a) era già visibilmente grande quasi il doppio di quello b).

Dopo aver lisato le cellule e aggiunto una soluzione per la precipitazione delle proteine, al nuovo surnatante di ciascuna aliquota, una volta separato, è stato aggiunto isopropanolo e il DNA ha formato un piccolo pellet biancastro ben visibile sul fondo di ciascuna provetta. Infine, mediante trattamento con etanolo si è fatto precipitare il DNA.

### **Quantificazione del DNA estratto.**

I campioni contenenti il DNA sono stati diluiti 100 volte e allo spettrofotometro ne è stata letta l'assorbanza a 260 nm e 280 nm. La concentrazione del DNA dei due campioni è stata ricavata dalla lettura dell'assorbanza a 260 nm utilizzando la legge di Lambert-Beer, dove:

$$[\text{DNA}]_{\mu\text{g/ml}} = \frac{A_{260} \times 50_{\mu\text{g/ml}} \times \text{fattore di diluizione}}{1 \text{ Unità assorbimento}}$$

	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>Ratio 260/280</b>	<b>[DNA] (µg/ml)</b>
<b>a)</b>	0,45	0,26	1,79	2250
<b>b)</b>	0,19	0,11	1,79	950

**Tabella 23.** Lettura di assorbanza a 260 nm e 280 nm, calcolo del rapporto tra le due e della concentrazione di DNA presente nei due campioni.

I due campioni sono risultati avere l'uno (a) concentrazione di DNA quasi doppia dell'altro (b) (Tab. 23). Il rapporto A260/A280 permette di valutare la contaminazione da proteine, il valore ottimale è per il DNA intorno a 1,8. Come visibile dai risultati riportati in tabella 4, il DNA di entrambi i campioni non è contaminato da proteine.

## DISCUSSIONE

Recentemente la ricerca sulla BPCO si è indirizzata verso lo studio del ruolo dell'invecchiamento precoce del polmone. È noto infatti che i pazienti con BPCO sono ad aumentato rischio di malattia cardiovascolare, di osteoporosi, di depressione e di rughe della pelle che sono associati a senescenza prematura [172].

Il lavoro di Rutten et al. [173] ha considerato un pannello di marcatori per indagare se la BPCO fosse associata ad un accelerato invecchiamento. Sono stati quindi valutati la funzionalità polmonare, la lunghezza dei telomeri dei leucociti, l'espressione nei linfociti di geni anti - *aging* (sirtuin1, klotho totale (T) e solubile (S)), di proteine di senescenza (p16/21) e di riparazione del DNA (Ku70/80 e TERF2), i marcatori di infiammazione sistemica e lo stress ossidativo, che rappresentano vari aspetti interconnessi del processo di invecchiamento. Tra questi, diversi marcatori sono risultati alterati nella BPCO, ma solo la lunghezza dei telomeri era costantemente associata alla funzionalità polmonare e perciò rappresenta un marcatore utile per esprimere l'invecchiamento accelerato nella BPCO. Alla luce di questo, si è scelto di adottare l'accorciamento dei telomeri come indice di invecchiamento polmonare.

I telomeri si accorciano ad ogni turno di divisione cellulare come risultato della senescenza cellulare replicativa. La lunghezza dei telomeri è ridotta durante la replicazione del DNA a causa del "problema della fine della replicazione", cioè l'estremità 5' del *lagging strand* non può essere replicata. Questa perdita di DNA dai telomeri è prevista essere di circa 10 paia di basi (bp) per ciclo cellulare. Tuttavia, il tasso osservato di perdita può essere maggiore e nell'uomo è stato stimato essere di 50-200 bp per divisione. Lo stress ossidativo è uno dei principali fattori che causano questo tasso di perdita superiore [174]. Perciò i BPCO, avendo livelli di stress ossidativo maggiori rispetto ai sani, dovrebbero avere una maggiore perdita in termini di bp, quindi un maggiore accorciamento dei telomeri rispetto ai soggetti non malati.

Dal nostro studio ci attendiamo inoltre che la lunghezza dei telomeri nel tessuto polmonare correli, oltre che con la funzionalità respiratoria, anche con la lunghezza dei telomeri nel sangue. Saferali e colleghi [172] hanno scoperto che c'è una correlazione significativa tra la lunghezza dei telomeri nel sangue e quella nel tessuto polmonare. Molti studi di lunghezza dei telomeri sono stati eseguiti utilizzando il DNA da cellule del sangue periferico ed i risultati sono stati estrapolati per i processi biologici che avvengono in altri tessuti. Infatti, la maggior parte degli studi che hanno valutato la lunghezza dei telomeri nei pazienti con BPCO sono stati eseguiti nel DNA dalle cellule del sangue [175-177]. I loro risultati indicano che la lunghezza dei telomeri nel sangue è correlata con la lunghezza dei telomeri nei polmoni e questo può portare a considerare la BPCO come una

malattia sistemica [178]. Così, l'esposizione dei polmoni al fumo di sigaretta può influenzare la lunghezza dei telomeri nei leucociti dovuta alla traslocazione di mediatori proinfiammatori [179] e di specie reattive dell'ossigeno dal polmone nella circolazione. Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato che la lunghezza dei telomeri nei leucociti era inferiore a quella nel tessuto polmonare. La lunghezza dei telomeri è noto che varia tra i diversi tessuti umani e che i telomeri dei leucociti generalmente siano più corti di quelli di altri tessuti [180], presumibilmente riflettendo i maggiori tassi di proliferazione delle cellule del sangue. È interessante notare che, Daniali et al. [180] hanno studiato gli adulti (età 18 anni) e il tasso di accorciamento dei telomeri era simile tra i vari tipi di tessuto, suggerendo che le differenze di lunghezza dei telomeri tra i tessuti fossero stabilite durante l'infanzia. Questo potrebbe spiegare perché i telomeri nei campioni polmonari erano più lunghi di quelli delle cellule del sangue, nonostante la maggiore esposizione presumibilmente del tessuto polmonare allo stress ossidativo attraverso il fumo di sigaretta. Secondo questi autori le differenze di lunghezza dei telomeri stabilite presto nella vita potrebbero quindi sopraffare qualsiasi effetto di esposizione al fumo che si verificano soprattutto in età adulta.

Dai risultati dell'analisi della lunghezza dei telomeri nei campioni dei nostri soggetti fumatori, ci si attende di osservare un accorciamento maggiore rispetto a quello dei soggetti sani non fumatori della stessa età. È noto che durante il naturale processo di invecchiamento degli individui sani, il polmone subisce una progressiva diminuzione della funzionalità polmonare. Diversi lavori hanno dimostrato che il fumo sigaretta accelera il tasso di declino della funzionalità polmonare, suggerendo che il fumo porti all'invecchiamento precoce del polmone [181].

Un recente studio condotto sul topo ha dimostrato che i telomeri più corti da soli non rappresentano la condizione sufficiente a indurre malattia polmonare spontanea; però, quando i topi con telomeri corti sono stati esposti sperimentalmente al fumo di sigaretta, avevano una soglia inferiore a sviluppare enfisema. Questi risultati suggeriscono che molteplici fattori contribuiscono allo sviluppo di malattie delle vie aeree indotte da fumo di sigaretta e che la lunghezza dei telomeri, almeno in parte, gioca un ruolo attivo parziale "sensibilizzando" le cellule ad altri eventuali danni e alla distruzione. Pertanto, meccanismi simili possono essersi conservati negli esseri umani, e gli individui con telomeri corti potrebbero avere un aumentato rischio per lo sviluppo della BPCO indotta da fumo [182].

Secondo Lee et al. [183] lo stato di fumatore non comporta una differenza significativa nella lunghezza dei telomeri delle cellule del sangue periferico. Tuttavia, i pazienti con BPCO presentano un accorciamento dei telomeri nei leucociti associato all'aumento del rischio di mortalità totale e per cancro. L'invecchiamento accelerato è di particolare rilevanza per la mortalità per cancro nella BPCO.

D'altra parte i dati provenienti dallo studio di Walters e collaboratori [182] forniscono la prova che il fumo accelera l'invecchiamento dell'epitelio delle piccole vie respiratorie a livello molecolare. Inoltre i cambiamenti biologici nell'epitelio delle piccole vie aeree in risposta al fumo di sigaretta possono essere osservati molto prima della comparsa della patologia.

Weischer e collaboratori [184] hanno misurato la lunghezza dei telomeri in 4.576 individui a distanza di 10 anni per valutare se il cambiamento di lunghezza dei telomeri fosse associato a mortalità e morbilità nella popolazione generale. Il fumo, l'aumento del peso corporeo e l'inattività fisica sono stati associati con l'accorciamento dei telomeri, ma non con il cambiamento della lunghezza dei telomeri dopo 10 anni di osservazione, e l'assunzione di alcol è stato associato con nessuno dei due. Inoltre, l'accorciamento dei telomeri non si associa in modo prospettico con mortalità o morbilità nella popolazione generale.

Shan et al. [185] hanno condotto un piccolo studio pilota nelle donne cinesi che cucinano bruciando biomasse per studiare l'inquinamento domestico dell'aria e l'impatto sull'ambiente e sulla salute umana. Hanno misurato nelle loro cucine per 24 ore l'esposizione personale alle particelle sottili (PM<sub>2,5</sub>) e nero-fumo. L'esposizione maggiore a PM<sub>2,5</sub> non è stata associata significativamente all'accorciamento dei telomeri rispetto alle donne del gruppo di esposizione più basso, dopo aggiustamento per età e indice di obesità. Tuttavia la dimensione del campione era piuttosto piccola.

Come emerge dallo studio della letteratura corrente, ad oggi non è noto se l'accorciamento dei telomeri guidi i processi patologici nel polmone o se questo fenomeno è di per sé sia come uno spettatore o solo una conseguenza di altri processi in atto.

## CONCLUSIONI

Da un'analisi d'insieme delle quattro parti in cui si è svolta la ricerca emerge che la presenza di BPCO influenza sia il carico di particelle carboniose nel polmone legate al traffico urbano (a parità di esposizione esterna dei soggetti), sia la biodiversità della colonizzazione microbica polmonare. Viceversa, il fumo di sigaretta non ha effetti sul contenuto di particelle carboniose, ma agisce sulla composizione del microbiota.

Gli approcci emergenti per studiare l'interazione gene-ambiente, che incide sulla patogenesi della malattia e progressione nella BPCO, stanno fornendo promettenti guide per nuovi biomarcatori. Questi includono: la caratterizzazione delle risposte del polmone agli inquinanti inalatori, l'applicazione della conoscenza del microbioma polmonare a soggetti BPCO e la determinazione dell'importanza di biomarcatori di invecchiamento, come l'accorciamento dei telomeri. Superare le sfide metodologiche riguardo il campionamento e i controlli di qualità consentirà di sviluppare biomarcatori ancora più robusti, facilmente accessibili e applicabili per ottimizzare la medicina personalizzata in pazienti con BPCO [186].

La spiegazione dei dati ottenuti nei fumatori e BPCO necessita di altri studi sulla funzionalità dei macrofagi nei soggetti con e senza malattia. I macrofagi tissutali residenti sono ormai riconosciuti come cellule polifunzionali e fondamentali per la manutenzione dei tessuti. E' dimostrato che i macrofagi contribuiscono alla rigenerazione dei tessuti, alla crescita compensatoria del polmone e possono reclutare cellule progenitrici. Sono ugualmente importanti nella lotta contro le infezioni e nel *signaling* infiammatorio, nell'eliminazione delle cellule apoptotiche e nell'induzione di alcuni processi rigenerativi [187].

Tra le persone con la medesima storia di fumo non tutti svilupperanno BPCO a causa delle differenze di predisposizione genetica verso la malattia o della durata di vita. I fattori di rischio per la BPCO possono anche essere correlati in un modo più complesso. In questo contesto la valutazione dell'invecchiamento polmonare dovuto ad inquinamento urbano e a fumo di sigaretta è molto importante per cercare di comprendere se l'accorciamento dei telomeri possa guidare i processi patologici nel polmone o se questo fenomeno vada di pari passo con la malattia o sia solo una conseguenza di altri processi in atto.

La BPCO deve essere considerata come un problema complesso. Gli sforzi della ricerca dovrebbero essere diretti anche verso la prevenzione e la rigenerazione, dal momento che nel trattamento sintomatico dei sintomi della malattia ad oggi nessuno dei farmaci disponibili per la BPCO si è dimostrato capace di modificare effettivamente il declino a lungo termine della funzionalità polmonare [187]. Sicuramente tra le misure che devono essere prese in considerazione

nella gestione della BPCO ci sono: la piena risoluzione dei processi infiammatori (limitato uso di farmaci anti-infiammatori), l'eliminazione di inquinanti atmosferici e il fumo (case e uffici “intelligenti”), il bilanciamento della risposta immunitaria in stretta relazione con il mantenimento di un microbioma diversificato (ad esempio, bassa impiego di antibiotici), una dieta sana con un buon carico di antiossidanti e l'attività fisica.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Manney S, Meddings CM, Harrison RM, Mansur AH, Karakatsani A, Analitis A, Katsouyanni K, Perifanou D, Kavouras IG, Kotronarou N, de Hartog JJ, Pekkanen J, Hämeri K, ten Brink H, Hoek G, Ayres JG. Association between exhaled breath condensate nitrate + nitrite levels with ambient coarse particle exposure in subjects with airways disease. *Occup Environ Med.* 2012; 69(9): 663-9.
- 2) Adamkiewicz G, Ebel S, Syring M, Slater J, Speizer FE, Schwartz J, Suh H, Gold DR. Association between air pollution exposure and exhaled nitric oxide in an elderly population. *Thorax.* 2004;59(3):204-9.
- 3) Zuurbier M, Hoek G, Oldenwening M, Meliefste K, van den Hazel P, Brunekreef B. Respiratory effects of commuters' exposure to air pollution in traffic. *Epidemiology.* 2011;22(2):219-27.
- 4) Gong H, Linn WS, Terrell SL et al. Exposures of elderly volunteers with and without chronic obstructive pulmonary disease (COPD) to concentrated ambient fine particulate pollution. *Inhal Toxicol* 2004; 16:731-44.
- 5) Nwokoro C, Ewin C, Harrison C, et al. Cycling to work in London and inhaled dose of black carbon. *Eur Respir J* 2012;40(5):1091-7.
- 6) Kunzli N, Perez L, Rapp R. Air quality and health. *European Respiratory Society booklet.* 2010:23-27.
- 7) Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut.* 2008 ; 151(2):362-7.
- 8) Sunyer J, Basagana X. Particles, and not gases, are associated with the risk of death in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Epidemiol* 2001; 30:1138-40.
- 9) Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2011. <http://www.goldcopd.it>.
- 10) Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:532-55.
- 11) Schwartz J, Dockery DW. Increased mortality in Philadelphia with daily air pollution concentrations. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:600-4.
- 12) Sunyer J, Schwartz J, Tobias A, Macfarlane D, Garcia J, Anto JM. Patients with chronic obstructive pulmonary disease are at increased risk of death associated with urban particle air pollution: a case-crossover analysis. *Am J Epidemiol* 2000; 151:50-6.
- 13) Sapkota AR, Berger S, Vogel TM. Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes. *Environ Health Perspect.* 2010 Mar; 118(3): 351-6.
- 14) El Ahmer OR, Essery SD, Saadi AT, Raza MW, Ogilvie MM, Weir DM, Blackwell CC. The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999; 23(1): 27-36.
- 15) Murin S, Bilello KS. Respiratory tract infections: another reason not to smoke. *Cleve Clin J Med.* 2005; 72(10): 916-20.

- 16) Charlson ES, Chen J, Custers-Allen R, Bittinger K, Li H, Sinha R, Hwang J, Bushman FD, Collman RG. Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers. *PLoS One*. 2010; 5(12): e15216.
- 17) Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res*. 2011; 166(2): 99-110.
- 18) British Lung Foundation. Air pollution and your lungs. 2009. Available at: [www.http://www.blf.org.uk/Page/Outdoor-Air-Pollution](http://www.blf.org.uk/Page/Outdoor-Air-Pollution) (Last accessed 16 December 2013).
- 19) D'Amato G, Cecchi L, D'Amato M, Liccardi G. Urban air pollution and climate change as environmental risk factor of respiratory allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010; 20:95–102.
- 20) Laumbach RJ, Kipen HM. Respiratory health effects of air pollution: update on biomass smoke and traffic pollution. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:3–11.
- 21) Pope CA, Ezzati M, Dockery DW. Fineparticulate air pollution and life expectancy in the United States. *N Engl J Med* 2009; 360:376–86.
- 22) Nicholson PJ, Cullinan P, Taylor AJ, Burge PS, Boyle C. Evidence based guidelines for the prevention, identification, and management of occupational asthma. *Occup Environ Med* 2005; 62:290–9.
- 23) Nathan RA, Eccles R, Howarth PH, Steinsvåg SK, Togias A. Objective monitoring of nasal patency and nasal physiology in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:S442–59.
- 24) Koren HS, Devlin RB. Human upper respiratory tract responses to inhaled pollutants with emphasis on nasal lavage. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 641:215–24.
- 25) Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1999; 54: 1061–9.
- 26) Olin AC, Stenfors N, Torén K et al. Nitric oxide (NO) in exhaled air after experimental ozone exposure in humans. *Respir Med* 2001; 95:491–5.
- 27) Steerenberg PA, Nierkens S, Fischer PH et al. Traffic-related air pollution affects peak expiratory flow, exhaled nitric oxide, and inflammatory nasal markers. *Arch Environ Health* 2001; 56:167–74.
- 28) Barraza-Villarreal A, Sunyer J, Hernandez-Cadena L et al. Air pollution, airway inflammation, and lung function in a cohort study of Mexico City school children. *Environ Health Perspect* 2008; 116:832–8.
- 29) Renzetti G, Silvestre G, D'Amario C et al. Less air pollution leads to rapid reduction of airway inflammation and improved airway function in asthmatic children. *Pediatrics* 2009; 123:1051–8.
- 30) Larsson BM, Grunewald J, Skold CM et al. Limited airway effects in mild asthmatics after exposure to air pollution in a road tunnel. *Respir Med* 2010; 104:1912–8.
- 31) Mudway IS, Blomberg A, Frew AJ, Holgate ST, Sandström T, Kelly FJ. Antioxidant consumption and repletion kinetics in nasal lavage fluid following exposure of healthy human volunteers to ozone. *Eur Respir J* 1999; 13:1429–38.
- 32) Gomes EC, Stone V, Florida-James G. Impact of heat and pollution on oxidative stress and CC16 secretion after 8 km run. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111:2089–97.

- 33) Romieu I, Barraza-Villarreal A, Escamilla-Nuñez C et al. Exhaled breath malondialdehyde as a marker of effect of exposure to air pollution in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:903–9.
- 34) Corradi M, Alinovi R, Goldoni M et al. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett* 2002; 134:219–25.
- 35) Mills NL, Robinson SD, Fokkens PH et al. Exposure to concentrated ambient particles does not affect vascular function in patients with coronary heart disease. *Environ Health Perspect* 2008; 116:709–15.
- 36) Hubbard HF, Sobus JR, Pleil JD, Madden MC, Tabucchi S. Application of novel method to measure endogenous VOCs in exhaled breath condensate before and after exposure to diesel exhaust. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877:3652–8.
- 37) Hussain S, Laumbach R, Coleman J et al. Controlled exposure to diesel exhaust causes increased nitrite in exhaled breath condensate among subjects with asthma. *J Occup Environ Med* 2012; 54:1186–91.
- 38) McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ et al. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med* 2007; 357:2348–58.
- 39) Zhang JJ, McCreanor JE, Cullinan P et al. Health effects of real-world exposure to diesel exhaust in persons with asthma. *Res Rep Health Eff Inst* 2009; 138:5–123.
- 40) Martins PC, Valente J, Papoila AL et al. Airways changes related to air pollution exposure in wheezing children. *Eur Respir J* 2012; 39:246–53.
- 41) Epton MJ, Dawson RD, Brooks WM et al. The effect of ambient air pollution on respiratory health of school children: a panel study. *Environ Health* 2008; 7:16.
- 42) Folino AF, Scapellato ML, Canova C et al. Individual exposure to particulate matter and the short-term arrhythmic and autonomic profiles in patients with myocardial infarction. *Eur Heart J* 2009; 30:1614–20.
- 43) Maestrelli P, Canova C, Scapellato ML et al. Personal exposure to particulate matter is associated with worse health perception in adult asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; 21:120–8.
- 44) Rundell KW, Caviston R. Ultrafine and fine particulate matter inhalation decreases exercise performance in healthy subjects. *J Strength Cond Res* 2008; 22:2–5.
- 45) Liu L, Poon R, Chen L et al. Acute effects of air pollution on pulmonary function, airway inflammation, and oxidative stress in asthmatic children. *Environ Health Perspect* 2009; 117:668–74.
- 46) Manney S, Meddings CM, Harrison RM et al. Association between exhaled breath condensate nitrate + nitrite levels with ambient coarse particle exposure in subjects with airways disease. *Occup Environ Med* 2012; 69:663–9.
- 47) Rava M, Varraso R, Decoster B et al. Plasma and exhaled breath condensate nitrite-nitrate level in relation to environmental exposures in adults in the EGEA study. *Nitric Oxide* 2012; 27:169–75.
- 48) Dompeling E, Rosias PPR, Jobsis Q. Exhaled breath condensate sample collection: standards and open issues. *Eur Respir Mon* 2010; 49:152–61.
- 49) Corradi M, Gergelova P, Mutti A. Use of exhaled breath condensate to investigate occupational lung diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10:93–8.

- 50) American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:912–30.
- 51) Newson EJ, Krishna MT, Lau LC, Howarth PH, Holgate ST, Frew AJ. Effects of short-term exposure to 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in sputum, exhaled nitric oxide, and lung function in subjects with mild atopic asthma. *J Occup Environ Med* 2000; 42:270–7.
- 52) Frampton MW, Utell MJ, Zareba W et al. Effects of exposure to ultrafine carbon particles in healthy subjects and subjects with asthma. *Res Rep Health Eff Inst* 2004; 126:1–47; discussion 49–63.
- 53) Gong H Jr, Linn WS, Clark KW et al. Exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient ultrafine particles in Los Angeles. *Inhal Toxicol* 2008; 20:533–45.
- 54) Behndig AF, Larsson N, Brown JL et al. Proinflammatory doses of diesel exhaust in healthy subjects fail to elicit equivalent or augmented airway inflammation in subjects with asthma. *Thorax* 2011; 66:12–9.
- 55) Cattoni I, Guarnieri G, Tosetto A et al. Mechanisms of decrease in fractional exhaled nitric oxide during acute bronchoconstriction. *Chest* 2013; 143:1269–76.
- 56) Fischer PH, Steerenberg PA, Snelder JD, van Loveren H, van Amsterdam JG. Association between exhaled nitric oxide, ambient air pollution and respiratory health in school children. *Int Arch Occup Environ Health* 2002; 75:348–53.
- 57) Koenig JQ, Jansen K, Mar TF et al. Measurement of offline exhaled nitric oxide in a study of community exposure to air pollution. *Environ Health Perspect* 2003; 111:1625–9.
- 58) Koenig JQ, Mar TF, Allen RW et al. Pulmonary effects of indoor- and outdoor- generated particles in children with asthma. *Environ Health Perspect* 2005; 113:499–503.
- 59) Mar TF, Jansen K, Shepherd K, Lumley T, Larson TV, Koenig JQ. Exhaled nitric oxide in children with asthma and short-term PM<sub>2.5</sub> exposure in Seattle. *Environ Health Perspect* 2005; 113:1791–4.
- 60) Delfino RJ, Staimer N, Gillen D et al. Personal and ambient air pollution is associated with increased exhaled nitric oxide in children with asthma. *Environ Health Perspect* 2006; 114:1736–43.
- 61) Holguin F, Flores S, Ross Z et al. Traffic-related exposures, airway function, inflammation, and respiratory symptoms in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:1236–42.
- 62) Murata A, Kida K, Hasunuma H et al. Environmental influence on the measurement of exhaled nitric oxide concentration in school children: special reference to methodology. *J Nippon Med Sch* 2007; 74:30–6.
- 63) Allen RW, Mar T, Koenig J et al. Changes in lung function and airway inflammation among asthmatic children residing in a woodsmokeimpacted urban area. *Inhal Toxicol* 2008; 20:423–33.
- 64) Lin W, Huang W, Zhu T et al. Acute respiratory inflammation in children and black carbon in ambient air before and during the 2008 Beijing Olympics. *Environ Health Perspect* 2011; 119:1507–12.
- 65) Sarnat SE, Raysoni AU, Li WW et al. Air pollution and acute respiratory response in panel of asthmatic children along the U.S.-Mexico border. *Environ Health Perspect* 2012; 120:437–44.

- 66) Berhane K, Zhang Y, Linn WS et al. The effect of ambient air pollution on exhaled nitric oxide in the Children's Health Study. *Eur Respir J* 2011; 37:1029–36.
- 67) Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T et al. Associations of primary and secondary organic aerosols with airway and systemic inflammation in an elderly panel cohort. *Epidemiology* 2010; 21:892–902.
- 68) Adar SD, Adamkiewicz G, Gold DR, Schwartz J, Coull BA, Suh H. Ambient and microenvironmental particles and exhaled nitric oxide before and after a group bus trip. *Environ Health Perspect* 2007; 115:507–12.
- 69) Jansen KL, Larson TV, Koenig JQ et al. Associations between health effects and particulate matter and black carbon in subjects with respiratory disease. *Environ Health Perspect* 2005; 113:1741–6.
- 70) Strak M, Boogaard H, Meliefste K et al. Respiratory health effects of ultrafine and fine particle exposure in cyclists. *Occup Environ Med* 2010; 67:118–24.
- 71) Klepczyńska Nystrom A, Svartengren M, Grunewald J et al. Health effects of a subway environment in healthy volunteers. *Eur Respir J* 2010; 36:240–8.
- 72) Klepczyńska-Nystrom A, Larsson BM, Grunewald J et al. Health effects of a subway environment in mild asthmatic volunteers. *Respir Med* 2012; 106:25–33.
- 73) Jacobs L, Nawrot TS, de Geus B et al. Subclinical responses in healthy cyclists briefly exposed to traffic-related air pollution: an intervention study. *Environ Health* 2010; 9:64.
- 74) Weichenthal S, Kulka R, Bellisle P et al. Personal exposure to specific volatile organic compounds and acute changes in lung function and heart rate variability among urban cyclists. *Environ Res* 2012; 118:118–23.
- 75) Khatri SB, Holguin FC, Ryan PB, Mannino D, Erzurum SC, Teague WG. Association of ambient ozone exposure with airway inflammation and allergy in adults with asthma. *J Asthma* 2009; 46:777–85.
- 76) Van Amsterdam JG, Verlaan BP, Van Loveren H et al. Air pollution is associated with increased level of exhaled nitric oxide in nonsmoking healthy subjects. *Arch Environ Health* 1999; 54:331–5.
- 77) Graveland H, Van Roosbroeck SA, Rensen WM, Brunekreef B, Gehring U. Air pollution and exhaled nitric oxide in Dutch schoolchildren. *Occup Environ Med* 2011; 68:551–6.
- 78) Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R et al. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:S9–23.
- 79) Tsoukias NM, George SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J Appl Physiol* 1998; 85:653–66.
- 80) Paggiaro PL, Chanez P, Holz O et al. Sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002; 37:3s–8s.
- 81) Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, Djukanovic R, Sterk PJ. Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 2002; 37:19s–23s.
- 82) Quirce S, Lemerle C, de Blay F et al. Noninvasive methods for assessment of airway inflammation in occupational settings. *Allergy* 2010; 65:445–58.
- 83) Hiltermann JT, Lapperre TS, van Bree L et al. Ozone induced inflammation assessed in sputum and bronchial lavage fluid from asthmatics: a new non-invasive tool in epidemiologic studies on air pollution and asthma. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:1448–54.

- 84) Arjomandi M, Schmidlin I, Girling P, Boylen K, Ferrando R, Balmes J. Sputum induction and bronchoscopy for assessment of ozone-induced airway inflammation in asthma. *Chest* 2005; 128:416–23.
- 85) Ratto J, Wong H, Liu J et al. Effects of multiday exposure to ozone on airway inflammation as determined using sputum induction. *Environ Health Perspect* 2006; 114:209–12.
- 86) Hernandez ML, Lay JC, Harris B et al. Atopic asthmatic subjects but not atopic subjects without asthma have enhanced inflammatory response to ozone. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:537–44.
- 87) Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P et al. Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:161–6.
- 88) Nordenhäll C, Pourazar J, Blomberg A, Levin JO, Sandström T, Adelroth E. Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: study of time kinetics using induced sputum. *Eur Respir J* 2000; 15:1046–51.
- 89) Nordenhäll C, Pourazar J, Ledin MC, Levin JO, Sandström T, Adelroth E. Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2001; 17:909–15.
- 90) Gong H Jr, Sioutas C, Linn WS. Controlled exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient particles in metropolitan Los Angeles. *Res Rep Health Eff Inst* 2003; 118:1–36; discussion 37–47.
- 91) Alexis NE, Lay JC, Zeman K et al. Biological material on inhaled coarse fraction particulate matter activates airway phagocytes in vivo in healthy volunteers. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1396–403.
- 92) Bosson J, Pourazar J, Forsberg B, Adelroth E, Sandström T, Blomberg A. Ozone enhances the airway inflammation initiated by diesel exhaust. *Respir Med* 2007; 101:1140–6.
- 93) Chimenti L, Morici G, Paterno A et al. Environmental conditions, air pollutants, and airway cells in runners: a longitudinal field study. *J Sports Sci* 2009; 27:925–35.
- 94) Kulkarni NS, Prudon B, Panditi SL, Abebe Y, Grigg J. Carbon loading of alveolar macrophages in adults and children exposed to biomass smoke particles. *Sci Total Environ* 2005; 345:23–30.
- 95) Fullerton DG, Jere K, Jambo K et al. Domestic smoke exposure is associated with alveolar macrophage particulate load. *Trop Med Int Health* 2009; 14:349–54.
- 96) Kulkarni N, Pierse N, Rushton L, Grigg J. Carbon in airway macrophages and lung function in children. *N Engl J Med* 2006; 355:21–30.
- 97) Grigg J, Kulkarni N, Pierse N, Rushton L, O’Callaghan C, Rutman A. Blackpigmented material in airway macrophages from healthy children: association with lung function and modeled PM10. *Res Rep Health Eff Inst* 2008; 134:1–23.
- 98) Jacobs L, Emmerechts J, Mathieu C et al. Air pollution related prothrombotic changes in persons with diabetes. *Environ Health Perspect* 2010; 118:191–6.
- 99) WHO. Outdoor air pollution (2013). Available at : [http://www.who.int/phe/health\\_topics/outdoorair/en](http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/en).
- 100) Lee LY, Widdicombe JG. Modulation of airway sensitivity to inhaled irritants: role of inflammatory mediators. *Environ Health Perspect* 2001;109 Suppl 4:585–9.
- 101) Artúñano B, Salvador P, Alonso DG, Querol X, Alastuey A. Influence of traffic on the PM10 and PM2,5 urban aerosol fractions in Madrid (Spain). *Sci Total Environ* 2004;334-335:111–23.

- 102) Kocbach A, Johansen BV, Schwarze PE, Namork E. Analytical electron microscopy of combustion particles: a comparison of vehicle exhaust and residential wood smoke. *Sci Total Environ* 2005;346(1-3):231–43.
- 103) Fireman EM, Lerman Y, Ganor E, et al. Induced sputum assessment in New York City firefighters exposed to World Trade Center dust. *Environ Health Perspect* 2004;112(15):1564–9.
- 104) Suglia SF, Gryparis A, Wright RO, Schwartz J, Wright RJ. Association of black carbon with cognition among children in a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol* 2008;167(3):280–6.
- 105) Karita K, Yano E, Jinsart W, Boudoung D, Tamura K. Respiratory symptoms and pulmonary function among traffic police in Bangkok, Thailand. *Arch Environ Health* 2001;56(5):467–70.
- 106) Brauer M, Avila-Casado C, Fortoul TI, Vedal S, Stevens B, Churg A. Air pollution and retained particles in the lung. *Environ Health Perspect* 2001;109(10):1039–43.
- 107) ARPAV, Relazione Regionale della Qualità dell’Aria, <http://www.arpa.veneto.it/>, 2014
- 108) Brugge D, Lane K, Padró-Martínez LT, et al. Highway proximity associated with cardiovascular disease risk: the influence of individual-level confounders and exposure misclassification. *Environ Health* 2013;12(1):84.
- 109) Hart JE, Rimm EB, Rexrode KM, Laden F. Changes in traffic exposure and the risk of incident myocardial infarction and all-cause mortality. *Epidemiology* 2013;24(5):734–42.
- 110) Wilker EH, Mostofsky E, Lue S-H, et al. Residential proximity to high-traffic roadways and poststroke mortality. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2013;22(8):e366–72.
- 111) Miranda ML, Edwards SE, Chang HH, Auten RL. Proximity to roadways and pregnancy outcomes. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2013;23(1):32–8.
- 112) Nuvolone D, Della Maggiore R, Maio S, et al. Geographical information system and environmental epidemiology: a cross-sectional spatial analysis of the effects of traffic-related air pollution on population respiratory health. *Environ Health* 2011;10:12.
- 113) Lindgren A, Stroh E, Montnémy P, Nihlén U, Jakobsson K, Axmon A. Traffic-related air pollution associated with prevalence of asthma and COPD/chronic bronchitis. A cross-sectional study in Southern Sweden. *Int J Health Geogr* 2009;8:2.
- 114) Provincia di Padova, NET Engineering, Piano Provinciale Viabilità, [www.provincia.pd.it](http://www.provincia.pd.it), 2012.
- 115) Kalappanavar NK, Vinodkumar CS, Gouli C, et al. Carbon particles in airway macrophage as a surrogate marker in the early detection of lung diseases. *Int J Occup Environ Med* 2012;3(2):68–75.
- 116) Becker BS, Soukup J. Coarse(PM(2.5–10)), fine(PM(2.5)), and ultrafine air pollution particles induce/increase immune costimulatory receptors on human blood-derived monocytes but not on alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health* 2003;66:847–859.
- 117) Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;257(2):209–26.
- 118) Sethi S. Chronic obstructive pulmonary disease and infection. Disruption of the microbiome? *Ann Am Thorac Soc.* 2014; 11: S43-7.

- 119) Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2008; **359**(22): 2355-65.
- 120) Han MK, Huang YJ, Lipuma JJ, et al. Significance of the microbiome in obstructive lung disease. *Thorax* 2012; **67** (5): 456-63.
- 121) Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010; **11**(1): 31-46.
- 122) Murray PR *Microbiologia*, Edises, Milano, Italia 2000; 7-8.
- 123) Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res*. 2011; **166**(2): 99-110.
- 124) Rivas R, Velázquez E, Zurdo-Piñeiro JL, Mateos PF, Martínez Molina E. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *J Microbiol Methods*. 2004; **56**(3): 413-26.
- 125) Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004; **17**(4): 840-62.
- 126) Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics*. 2011; **38**(3): 95-109.
- 127) Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB. Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PLoS One*. 2011 Feb 22;6(2):e16384.
- 128) Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, Mira A. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3562-8.
- 129) Galiana A, Aguirre E, Rodriguez JC, Mira A, Santibañez M, Candela I, Llavero J, Garcinuño P, López F, Ruiz M, Garcia-Pachon E, Royo G. Sputum microbiota in moderate versus severe patients with COPD. *Eur Respir J*. 2014 Jun;43(6):1787-90.
- 130) Millares L, Ferrari R, Gallego M, Garcia-Núñez M, Pérez-Brocal V, Espasa M, Pomares X, Monton C, Moya A, Monsó E. Bronchial microbiome of severe COPD patients colonised by *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Jul;33(7):1101-11.
- 131) Garcia-Núñez M, Millares L, Pomares X, Ferrari R, Pérez-Brocal V, Gallego M, Espasa M, Moya A, Monsó E. Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol*. 2014 Dec;52(12):4217-23.
- 132) Aguirre E, Galiana A, Mira A, Guardiola R, Sánchez-Guillén L, Garcia-Pachon E, Santibañez M, Royo G, Rodríguez JC. Analysis of microbiota in stable patients with chronic obstructive pulmonary disease. *APMIS*. 2015 May;123(5):427-32.
- 133) Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Oct 15;184(8):957-63.
- 134) Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*. 2013 Oct;10(10):996-8.
- 135) Wang, Q, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 73(16):5261-7.

- 136) Cole, J. R., Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai, D. M. McGarrell, Y. Sun, C. T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske, and J. M. Tiedje. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis *Nucl. Acids Res.* 42(Database issue):D633-D642.
- 137) Jost, Lou. The relation between evenness and diversity. *Diversity* 2.2 (2010): 207-232.
- 138) Hill, Mark O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54.2 (1973): 427-432.
- 139) Pielou, Evelyn C. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of theoretical biology* 13 (1966): 131-144.
- 140) Whittaker, Robert Harding. Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological monographs* 30.3 (1960): 279-338.
- 141) Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; 26:139–40.
- 142) Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 2010;11:R25.
- 143) Rogers GB, Daniels TW, Tuck A, Carroll MP, Connett GJ, David GJ, Bruce KD. Studying bacteria in respiratory specimens by using conventional and molecular microbiological approaches. *BMC Pulm Med.* 2009 Apr 15;9:14.
- 144) Garmendia J, Morey P, Bengoechea JA. Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions. *Eur Respir J.* 2012 Feb;39(2):467-77.
- 145) Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010 Jan 5;5(1):e8578.
- 146) Bittar F, Richet H, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Stremmer N, Sarles J, Raoult D, Rolain JM. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2008 Aug 6;3(8):e2908.
- 147) Rouzé A, Cottreau A, Nseir S. Chronic obstructive pulmonary disease and the risk for ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Crit Care.* 2014 Oct;20(5):525-31.
- 148) Marri PR, Stern DA, Wright AL, Billheimer D, Martinez FD. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Feb;131(2):346-52.
- 149) Pragman AA, Kim HB, Reilly CS, Wendt C, Isaacson RE. The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2012;7(10):e47305.
- 150) Park H, Shin JW, Park SG, Kim W. Microbial communities in the upper respiratory tract of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2014 Oct 16;9(10):e109710.
- 151) Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, Flores SC, Fontenot AP, Ghedin E, Huang L, Jablonski K, Kleeerup E, Lynch SV, Sodergren E, Twigg H, Young VB, Bassis CM, Venkataraman A, Schmidt TM, Weinstock GM; Lung HIV Microbiome Project. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 May 15;187(10):1067-75.
- 152) Lee CC, Middaugh NA, Howie SR, Ezzati M. Association of secondhand smoke exposure with pediatric invasive bacterial disease and bacterial carriage: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2010 Dec 7;7(12):e1000374.

- 153) Shukla SK, Paustian DL, Stockwell PJ, Morey RE, Jordan JG, Levett PN, Frank DN, Reed KD. Isolation of a fastidious *Bergeyella* species associated with cellulitis after a cat bite and a phylogenetic comparison with *Bergeyella zoohelcum* strains. *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):290-3.
- 154) Romani Vestman N, Chen T, Lif Holgerson P, Öhman C, Johansson I. Oral Microbiota Shift after 12-Week Supplementation with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and PTA 5289; A Randomized Control Trial. *PLoS One*. 2015 May 6;10(5):e0125812.
- 155) Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Oct 1;4(7):512-21.
- 156) Sim K., Cox M.J., Wopereis H., Martin R., Knol J., Li M.-S., Cookson W.O.C.M., Moffatt M.F., Kroll J.S. Improved detection of bifidobacteria with optimised 16S rRNA-gene based pyrosequencing. *PLoS ONE* 2012;7:e32543.
- 157) Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glockner F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2012;41:e1.
- 158) Klappenbach J.A., Saxman P.R., Cole J.R., Schmidt T.M. Rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:181-184.
- 159) Santamaria M, Fosso B, Consiglio A, De Caro G, Grillo G, Licciulli F, Liuni S, Marzano M, Alonso-Alemany D, Valiente G, Pesole G. Reference databases for taxonomic assignment in metagenomics. *Brief Bioinform*. 2012 Nov;13(6):682-95.
- 160) Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Ann Am Thorac Soc*. 2014 Jan;11(1):108-16.
- 161) Kong CM, Lee XW, Wang X. Telomere shortening in human diseases. *FEBS J*. 2013; 280(14): 3180-93.
- 162) Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM: Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:17312-17315.
- 163) Aviv A: Telomeres and human aging: facts and fibs. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004; 204: pe43.
- 164) Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD: Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005; 366: 662-664.
- 165) Oikawa S, Kawanishi S: Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett* 1999; 453:365-368.
- 166) Hoxha M, Dioni L, Bonzini M, Pesatori AC, Fustinoni S, Cavallo D, Carugno M, Albetti B, Marinelli B, Schwartz J, Bertazzi PA, Baccarelli A. Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers. *Environ Health*. 2009; 8: 41.
- 167) von Zglinicki T: Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*. 2002; 27: 339-344.
- 168) Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ: White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 842-846.

- 169) Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Walston J, Kimura M, Aviv A: Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 14-21.
- 170) Samani NJ, Boulby R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH: Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 2001; 358: 472-473.
- 171) Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009 Feb;37(3):e21.
- 172) Saferali A, Lee J, Sin DD, Rouhani FN, Brantly ML, Sandford AJ. Longer telomere length in COPD patients with  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency independent of lung function. *PLoS One.* 2014 Apr 24;9(4):e95600.
- 173) Rutten EP, Gopal P, Wouters EF, Franssen FM, Hageman GJ, Vanfleteren LE, Spruit MA, Reynaert NL. Various mechanistic pathways representing the ageing process are altered in COPD. *Chest.* 2015 Jun 11.
- 174) Houben JM, Mercken EM, Ketelslegers HB, Bast A, Wouters EF. Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2009; 103: 230–236.
- 175) Holz O, Zühlke I, Jaksztat E, Müller KC, Welker L. Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *Eur Respir J* 2004;24: 575–579.
- 176) Morla M, Busquets X, Pons J, Sauleda J, MacNee W. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006; 27: 525–528.
- 177) Albrecht E, Sillanpaa E, Karrasch S, Alves AC, Codd V. Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. *Eur Respir J* 2013: Dec 5.
- 178) van Eeden SF, Sin DD Chronic obstructive pulmonary disease: a chronic systemic inflammatory disease. *Respiration* 2008; 75: 224–238.
- 179) Kido T, Tamagawa E, Bai N, Suda K, Yang HH, et al. Particulate matter induces translocation of IL-6 from the lung to the systemic circulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44: 197–204.
- 180) Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun* 2013; 4: 1597.
- 181) Kerstjens HA, Rijcken B, Schouten JP, Postma DS: Decline of FEV1 by age and smoking status: facts, figures, and fallacies. *Thorax* 1997, 52:820–827.
- 182) Walters MS, De BP, Salit J, Buro-Auriemma LJ, Wilson T, Rogalski AM, Lief L, Hackett NR, Staudt MR, Tilley AE, Harvey BG, Kaner RJ, Mezey JG, Ashbridge B, Moore MA, Crystal RG. Smoking accelerates aging of the small airway epithelium. *Respir Res.* 2014;15:94.
- 183) Lee J, Sandford AJ, Connett JE, Yan J, Mui T, Li Y, Daley D, Anthonisen NR, Brooks-Wilson A, Man SF, Sin DD. The relationship between telomere length and mortality in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *PLoS One.* 2012;7(4):e35567.
- 184) Weischer M, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Telomere shortening unrelated to smoking, body weight, physical activity, and alcohol intake: 4,576 general population individuals with repeat measurements 10 years apart. *PLoS Genet.* 2014 Mar 13;10(3):e1004191.
- 185) Shan M, Yang X, Ezzati M, Chaturvedi N, Coady E, Hughes A, Shi Y, Yang M, Zhang Y, Baumgartner J. A feasibility study of the association of exposure to biomass smoke with vascular function, inflammation, and cellular aging. *Environ Res.* 2014;135:165-72.

- 186) Shaw JG, Vaughan A, Dent AG, O'Hare PE, Goh F, Bowman RV, Fong KM, Yang IA. Biomarkers of progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Thorac Dis.* 2014;6(11):1532-47.
- 187) Bagdonas E, Raudoniute J, Bruzauskaite I, Aldonyte R. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015;10:995-1013.