

# INDICE

	<b>Pagina</b>
<b>RIASSUNTO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>INTRODUZIONE</b> .....	9
<b>SCOPO</b> .....	22
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	23
– Disegno dello studio.....	23
– Misurazione dell'Ossido Nitrico Esalato.....	25
– Misurazione del pH nel condensato dell'aria espirata.....	26
– Test di funzionalità respiratoria.....	26
– Diffusione del CO.....	27
– Induzione ed analisi dell'espettorato indotto.....	27
– Diagnosi di asma professionale da isocianati.....	28
– Test di provocazione bronchiale aspecifico con metacolina....	29
– Test di provocazione bronchiale specifico con isocianati.....	30
– Prelievo del sangue venoso e raccolta urine per il dosaggio CC-16.....	31
– Analisi statistica.....	32
<b>RISULTATI</b> .....	33
<b>DISCUSSIONE</b> .....	38
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	46
<b>TABELLE E FIGURE</b> .....	54

## RIASSUNTO

L'infiammazione è in gran parte responsabile dell'iperreattività bronchiale, della limitazione del flusso aereo e dell'ipersecrezione di muco nelle malattie polmonari croniche ostruttive, come ad esempio nell'asma, e questo ha portato ad indagare in modo estensivo i tipi di cellule e mediatori responsabili della cascata di eventi che dallo stimolo iniziale portano all'alterata funzione delle vie aeree. In passato si pensava che la funzione maggiore dell'epitelio respiratorio fosse quella di formare una barriera fisica. In realtà, esso costituisce l'interfaccia tra l'ambiente interno e quello esterno. L'epitelio bronchiale, infatti risponde a variazioni dell'ambiente esterno liberando un vasto numero di molecole e mediatori che modificano il pH del lining fluid e trasmettono segnali alle cellule del sistema immunitario e richiamano cellule infiammatorie nel lume delle vie aeree.

L'espressione della forma inducibile dell'ossido nitrico sintetasi (iNOS) nell'epitelio delle vie aeree, responsabile delle concentrazioni di ossido nitrico esalato (eNO) rilevabili nell'aria esalata, è marcatamente espansa dopo esposizione a citochine proinfiammatorie e ad ossidanti. Per questa ragione iNOS è stata implicata nella patogenesi della risposta infiammatoria bronchiale e i pazienti con asma bronchiale hanno un marcato aumento dell'NO nell'aria esalata.

La perdita di integrità dell'epitelio bronchiale si può associare con alterazioni delle proprietà secretive ed aumento della permeabilità. La proteina della cellula di Clara (CC16) è una piccola proteina antiinfiammatoria ed immunosoppressiva che può partecipare alla protezione del tratto respiratorio ed è stata dosata nel liquido di lavaggio broncoalveolare. Aumentati livelli di CC16 nel siero o nelle urine possono indicare un aumento della permeabilità della barriera epiteliale.

Nei Paesi industrializzati l'asma professionale è una delle più comuni patologie respiratorie legate al lavoro. Importanti agenti eziologici dell'asma professionale sono gli isocianati che per le loro caratteristiche chimico fisiche hanno potere irritante e

sensibilizzante. Dagli isocianati si ottengono per polimerizzazione le resine polimeriche, ampiamente usate come vernici, schiume ed elastomeri.

In questo studio si è ipotizzato che la risposta acuta delle vie aeree indotta da isocianati in soggetti sensibilizzati, sia caratterizzata da richiamo di cellule infiammatorie nelle vie aeree, valutabile tramite espettorato indotto e, da un particolare profilo di mediatori liberati dall'epitelio bronchiale nell'aria esalata (NO esalato) ed alterazioni del lining fluid quantificabili nel condensato dell'aria espirata (pH) e danno bronchiolare dosando mediatori, propri delle vie aeree, nel plasma e nelle urine.

In una prima fase dello studio sono state standardizzate le metodiche della misurazione dell'ossido nitrico esalato, del pH del condensato dell'aria esalata e della CC16 nel siero e nelle urine. Successivamente sono stati selezionati 15 soggetti con asma professionale da isocianati, 24 soggetti di controllo, non sensibilizzati e 3 soggetti con rinite professionale da isocianati.

Il monitoraggio della risposta acuta delle vie aeree è stata eseguita confrontando i soggetti con asma professionale con i soggetti di controllo.

Ogni soggetto è stato sottoposto all'esposizione sperimentale in laboratorio a concentrazioni di isocianati (TDI, MDI, o HDI) al di sotto del TLV Stel (20 ppb) ed a placebo in giorni diversi, in singolo cieco.

La funzione respiratoria e le concentrazioni di NO esalato sono state monitorate per sette ore dopo le esposizioni. Il condensato dell'aria esalata è stato raccolto prima e sette ore dopo esposizione a placebo ed ad isocianati, per la determinazione del pH. In seguito le successive misurazioni e raccolte sono state eseguite alla 24°, 48° ora, 7 e 30 giorni dopo esposizione ad isocianati.

L'espettorato è stato indotto, con aerosol di soluzione salina ipertonica (3-4%), prima e 24 ore dopo esposizione. Agli stessi tempi e 48 ore dopo esposizione sono stati raccolti campioni di sangue venoso ed urine per la determinazione della proteina della cellula di Clara (CC16).

I soggetti con test di provocazione bronchiale specifico positivo (SIC+), in condizioni basali, presentavano una concentrazione di eNO pari a 67,12 ppb [16] (geometric mean [SE]). Dopo trenta minuti dal test specifico, tale valore ha subito una riduzione significativa (45ppb[13,7]) che si è mantenuta tale fino alla seconda ora dopo esposizione 53,7ppb[14].

In seguito la concentrazione di eNO ha subito un progressivo incremento fino a raggiungere i valori massimi alla 48° ora (118ppb[25]) dopo esposizione. Il 7° giorno dopo esposizione, l'eNO era tornato ai valori di base. Nei soggetti di controllo, con test di provocazione bronchiale specifico negativo (SIC-) non è stata osservata alcuna variazione nella concentrazione di eNO prima e dopo esposizione ad isocianati. Per quanto riguarda i soggetti con rinite da isocianati l'eNO presentava un andamento analogo a quello dei soggetti di controllo.

I SIC+ presentavano un incremento significativo degli eosinofili nell'espettorato indotto 24 ore dopo esposizione ad isocianati rispetto al valore di base ( $p=0.01$ ). Nei soggetti di controllo, invece, si è osservato una diminuzione significativa della percentuale di eosinofili nell'espettorato 24 ore dopo esposizione ad isocianati ( $p=0,041$ ). E' stata inoltre osservata una differenza significativa tra la percentuale di eosinofili nell'espettorato raccolto 24 ore dopo esposizione ad isocianati nei soggetti positivi al test rispetto a quelli di controllo ( $p=0,0002$ ). Non differenze significative sono state osservate nella percentuale di neutrofilo, dopo esposizione ad isocianati in entrambi i gruppi.

Raggruppando tutti i soggetti, la variazione della concentrazione di eNO alla 48 ora rispetto al valore base (espresso in logaritmo), correlava positivamente con la variazione di eosinofili (espressa in logaritmo), alla 24° ora rispetto alla base ( $p<0,05$ ;  $\rho= 0,496$ ).

Le misurazioni del pH nell'EBC hanno evidenziato un incremento significativo del pH alla 7° ora dopo esposizione a placebo (nel pomeriggio) rispetto ai valori basali pre-esposizione (al mattino), sia nei SIC+ che nei SIC-, rispettivamente con una significatività di  $p=0,005$  e  $p=0,0013$ . Lo stesso pattern è stato osservato in entrambi i

gruppi di soggetti, nel giorno di esposizione ad isocianati, ma le differenze non raggiungevano significatività statistica.

I valori basali di CC16 nel siero e nelle urine nei SIC+ erano significativamente più elevati rispetto ai SIC-, rispettivamente di  $p=0,0282$  e  $p=0,0169$ . Dopo 7 e 24 ore dall'esposizione ad isocianati non si è osservata alcuna variazione significativa sia nei SIC+ che nei SIC-.

In questo studio abbiamo dimostrato che la reazione asmatica indotta da isocianati si associa ad un incremento significativo della concentrazione di eNO che raggiunge il massimo valore alla 48° ora dopo esposizione. Tale aumento è tardivo perché si evidenzia quando la broncoostruzione si è risolta e risulta sfasato di circa 24 ore rispetto all'aumento degli eosinofili nell'espettorato che in precedenti studi hanno mostrato incrementi tra l'8° e la 24° ora e ritorno a valori basali dopo 48 ore. Inoltre l'aumento degli eosinofili sembra predire l'aumento dell'ossido nitrico e questo conferma che, nell'asma bronchiale, l'eNO riflette l'eosinofilia delle vie aeree. L'aumento di eosinofili nell'espettorato e l'aumento tardivo dell'eNO esalato sono specifici dei soggetti che sviluppano reazione asmatica perché tali cambiamenti non sono stati osservati né nei soggetti di controllo, né in quelli che sviluppano rinite da isocianati. Il pH del condensato dell'aria espirata non si associa a variazioni correlate alla reazione asmatica indotta da isocianati. L'aumento in entrambi i gruppi nel pomeriggio rispetto alla misurazione pre-esposizione eseguita al mattino suggerisce un ritmo circadiano che viene attenuato in seguito all'esposizione ad isocianati. Sembra quindi che gli isocianati alterino in qualche modo il ritmo circadiano del pH. Infine i soggetti con asma bronchiale da isocianati presentavano un valore di CC16 più elevato sia nel siero che nelle urine, pre-esposizione, rispetto ai soggetti di controllo. Questo suggerisce che nell'asma ci sia un'alterazione dell'epitelio bronchiolare in condizioni di base. L'esposizione acuta ad isocianati non comporta variazioni significative della CC16 sia nel siero che nelle urine.

## ABSTRACT

Inflammation is the main responsible for bronchial hyperresponsiveness, airflow limitation and mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary diseases as for example in asthma. This has brought us to extensively investigate into the cells types and mediators responsible for the cascade of events which lead from the initial stimulus to an altered airway function.

In the past the main function of the respiratory epithelium was thought to be an inert barrier. It is, in fact, the interface between the internal milieu and the external environment. The bronchial epithelium actually answers external environment changes by freeing a large number of molecules and mediators which modify the lining fluid pH, transmit signals to the immunitary system cells and draws inflammatory cells into the airway lumen.

The expression of inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) in the airway epithelium, responsible for the concentration of nitric oxide exhaled (eNO) detectable in the exhaled air, is greatly upregulated after exposure to pro-inflammatory cytokines and oxidants agents. For this reason iNOS has been implicated in the pathogenesis of airway inflammatory response. Patients with asthma have a marked increase in NO in exhaled air.

The loss of integrity of the bronchial epithelium can be associated with alterations of the secretory properties and of an increase of permeability. The Clara cell protein (CC16) is a small anti-inflammatory and immunosuppressive protein which can take part in the protection of the airway and has been measured out in the liquid for the bronchoalveolar lavage (BAL). Increased levels of CC16 in the serum or in the urine may indicate altered permeability of the epithelium barrier due to lung damage.

Occupational asthma is one of the most common respiratory diseases linked to work, in industrialized countries. Isocyanates are important aetiological agents of occupational asthma: because of their chemical and physical characteristics they

have an irritating and sensitizing power. Polymeric resins, which are widely used as paints, foams and elastomers derive from isocyanates polymerization .

The present research has hypothesised that the acute response of the respiratory tract induced by isocyanates in sensitised patients, is characterised by the attraction of inflammatory cells into the airway which can be measured by induced sputum, by a particular profile of mediators freed by the epithelium in the exhaled breath, by lining fluid alterations quantifiable in the exhaled breath condensate (pH) and by a bronchiolar damage on measuring mediators peculiar of the airway, in plasma and urine.

In the first phase of the study the measuring methods for exhaled nitric oxide, exhaled breath pH condensate and CC16 in serum and urine were standardized. Then we selected 15 patients with occupational asthma caused by isocyanates, 24 non sensitised control patients and 3 with occupational rhinitis from isocyanates.

Monitoring of the airway acute response was carried out by comparing patients with occupational asthma with the control ones.

Each patient was experimentally exposed to isocyanates concentrations (TDI,MDI or HDI) below TLV Stel (20ppb) and to placebo on different days, in single blind.

The Respiratory function and exhaled NO concentrations were monitored for seven hours after placebo and isocyanates exposure. In order to determine the pH, the exhaled breath condensate was collected seven hours before and after placebo and isocyanates exposure. Later on, subsequent measurements and collections were carried out at the 24<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup> hours, 7<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days after exposure to isocyanates.

Sputum was induced by hypertonic salty solution aerosol (3-4%) before and 24 hours after exposure. At the same times and 48 hours after exposure venous blood samples and urine were taken in order to determine the clara cell protein (CC16).

The patients with positive specific challenge test (SIC+), in basic situation, presented an eNO concentration of 67.12 ppb[16](geometric mean [SE]). 30 minutes after the specific challenge test, this figure underwent a significant reduction (45 ppb[13.7]) which kept the same values until the second hour after exposure 53.7ppb [14].

Then the eNo concentration increased and reached the highest figure at the 48<sup>th</sup> hour (118ppb[25]) after exposure. ON the 7<sup>th</sup> day after exposure eNo had gone back to the basic value. In the control patients, with a negative specific challenge test (SIC-) no variation in the eNO concentration before and after exposure to isocyanates. As for subjects with rhinitis deriving from isocyanates the eNo concentration had a similar course as the control patients' one.

The SIC+ ones showed a meaningful increase in the eosinophils in the induced sputum 24 hours from exposure to isocyanates compared to the basic values ( $p=0.01$ ). In control patients instead, a meaningful diminution of the percentage of the eosinophils in the sputum 24 hours after exposure to isocyanates ( $p=0.041$ ) was observed. Moreover a meaningful difference was also observed between the percentage of eosinophils in the sputum of 24 hours after exposure to isocyanates in test positive patients compared to the control ones ( $p= 0.0002$ ). No meaningful difference was observed in the neutrophils percentage after exposure to isocyanates in both groups. Grouping all the patients, the variation in the eNo concentration at the 48<sup>th</sup> hour compared to the basic value (expressed in logarithm) positively correlated with the eosinophils variation (expressed in logarithm) at the 24<sup>th</sup> hour compared to the basis ( $p<0.05$ ,  $\rho=0.496$ ).

The pH measurement in the EBC have highlighted a significant increase of the pH at the 7<sup>th</sup> hour after exposure to placebo (in the afternoon) compared to the basic figures pre-exposure (in the morning) both in the SIC+ and in the SIC- patients, respectively with a significance of  $p=0.005$  and  $p=0.0013$ . The same pattern was observed, in both groups of patients, on the exposure to isocyanates day, although the differences did not statistical significant.

The basal figures of CC16 in the serum and urine in SIC+ patients were considerably higher than in the SIC- ones:  $p=0.0282$  and  $p=0.0169$  respectively.

After 7 and 24 hours from exposure to isocyanates no significant variation was observed both in the SIC+ and SIC- patients.

In this research it has been demonstrated that the asthmatic reaction induced by isocyanates is linked to a significant increase in the eNo concentration which reaches the highest figure at the 48<sup>th</sup> hour after exposure. This increase is belated as it reveals when the bronchoconstriction has been resolved; it is also 24 hours post posed with respect to the increase of the eosinophils in the sputum, which in previous studies showed increase between the 8<sup>th</sup> and the 24<sup>th</sup> hours shifted and a return to basal values after 48 hours. Moreover, the eosinophils increase seems to prevent the increase of Nitric oxide thus confirming that in bronchial asthma eNo is a sign of airway eosiniphilia. The increase in eosinophils in sputum and the belated one in exhaled eNo are typical of patients developing an asthmatic reaction as these changes have not been osberved either in control patients or in those with rhinitis from ysocyanates. The pH of the condensate in the exhaled breath does not associate with variations linked to the asthmatic reaction induced by isocyanates.

Consequently isocyanates somehow seem to alter the ph circadian rhythm.

To conclude, patients with bronchial asthma from isocyanates showed a CC16 basic value higher both in the serum and urine pre-exposure with respect to control subjects, which suggests that in asthma there is an alteration of the bronchiolar epithelium in basic situations. A severe exposition to ysocyanates does not imply meaningful variations of CC16 in serum and urine.

## INTRODUZIONE

L'infiammazione delle vie aeree è in gran parte responsabile dell'iperreattività bronchiale, della limitazione del flusso aereo e dell'ipersecrezione di muco nelle malattie polmonari croniche ostruttive, come ad esempio nell'asma, e questo ha portato ad indagare in modo estensivo i tipi di cellule e mediatori responsabili della cascata di eventi che dallo stimolo iniziale portano all'alterata funzione delle vie aeree [1,2]. Tradizionalmente l'epitelio bronchiale delle vie aeree e delle regioni alveolari è stato a lungo considerato svolgere mere funzioni di barriera di separazione dall'ambiente esterno [3]. Attualmente vi è unanime riconoscimento del fondamentale ruolo svolto dall'epitelio bronchiale in molte altre funzioni nelle vie aeree [4]. Infatti, oltre ad assicurare un'estesa superficie per lo scambio di gas, esso partecipa al mantenimento dell'omeostasi, al metabolismo e/o clearance di mediatori endogeni e sostanze xenobiotiche, all'attivazione di cellule infiammatorie in risposta al danno e all'attività rigenerativa. In questo senso, il numero di mediatori che l'epitelio bronchiale è in grado di produrre, sia a livelli basali che dopo stimolazione, è enorme e ne conferma il ruolo centrale nell'attività di controllo della normale funzionalità delle vie aeree. Oltre a mediatori lipidici, fattori di crescita e citochine, esso produce e rilascia in notevole quantità diversi tipi di proteine solubili di basso peso molecolare [3]. L'epitelio bronchiale, risponde quindi alle variazioni dell'ambiente esterno liberando un vasto numero di molecole e mediatori che possono modificare il pH del lining fluid, liquido di rivestimento delle vie aeree, trasmettere segnali alle cellule del sistema immunitario e richiamare cellule infiammatorie nel lume delle vie aeree.

Il pH del lining fluid è rilevabile nel condensato dell'aria espirata (EBC), un fluido biologico che viene raccolto raffreddando l'aria esalata facendo respirare il paziente a volume corrente. L'EBC contiene vapor acqueo e goccioline microscopiche la cui combinazione sembra riflettere quella del fluido di rivestimento delle vie aeree [5,6]. La raccolta dell'EBC rappresenta un metodo per catturare sostanze esalate volatili e

non volatili. Attraverso il raffreddamento dell'aria esalata sia l'acqua condensata che le goccioline microscopiche vengono raccolte formando l'EBC che può essere analizzato facilmente. L'EBC contiene numerose sostanze come adenosina, ammoniaca, perossido d'idrogeno, leucotrieni, ossido dell'azoto, peptici, citochine e metaboliti dell'acido arachidonico che possono essere usate come biomarcatori di patologie polmonari [6]. La concentrazione di questi mediatori è influenzata dallo stato patologico polmonare e dagli interventi terapeutici e tali mediatori influenzano il pH dell'EBC [7]. La raccolta dell'EBC è un metodo non invasivo, semplice, economico e ripetibile che non provoca effetti avversi nel paziente [8]. Permette infatti di raccogliere composti sia volatili che non senza ricorrere a procedure diagnostiche invasive come le biopsie bronchiali e il lavaggio broncoalveolare (BAL) [6].

Hunt e coll. [9] hanno dimostrato che la misura del pH nel condensato può essere usato come marker di riacutizzazione dell'asma dal momento che diminuisce e che la semplice misura del pH nel condensato esalato potrebbe essere usata per studiare l'equilibrio acido-base nelle vie aeree dei soggetti asmatici.

Kostikas e coll. [10] hanno dimostrato che i valori di pH nell'EBC in adulti asmatici sono più bassi rispetto a quelli dei controlli e che questi sono correlati negativamente con il numero di eosinofili nell'espettorato indotto e con l'8-isoprostano che è un marcatore dello stress ossidativo [11].

Ancora Hunt e coll. hanno dimostrato che le cellule epiteliali delle vie aeree e del polmone producono ammoniaca a partire dalla glutamina tramite una reazione catalizzata dalla glutaminasi. La produzione dell'ammoniaca potrebbe rappresentare un tentativo da parte delle cellule epiteliali di tamponare lo stimolo acido mantenendo l'omeostasi del pH delle vie aeree. L'attività della glutaminasi è inibita dalle citochine infiammatorie come l'interferone  $\gamma$  e il tumor necrosis factor  $\alpha$  [12], mentre la somministrazione di corticosteroidi che sopprimono le citochine infiammatorie [13] induce l'espressione della glutaminasi [10]. Durante la riacutizzazione dell'asma i livelli di ammoniaca e il pH sono più bassi mentre l'espressione della glutaminasi è

diminuita suggerendo che l'inibizione della glutamminasi potrebbe contribuire all'abbassamento del pH delle vie aeree nei soggetti asmatici. Il decremento dell'ammoniaca potrebbe essere necessario ma non sufficiente per spiegare l'acidificazione.

Carraro e coll [14] hanno dimostrato che i valori di pH in bambini asmatici sono significativamente più bassi rispetto al gruppo di controllo e correlano con i livelli di ammoniaca nell'EBC. Kostikas e coll [10] hanno osservato livelli più alti di pH nell'EBC di asmatici in trattamento con corticosteroidi rispetto a pazienti non in trattamento. Anche Hunt e coll [10] hanno riportato che il pH dell'EBC di pazienti con riacutizzazione di asma aumenta significativamente dopo terapia steroidea sistemica. Hanno inoltre dimostrato che il pH o l'ammoniaca sono negativamente correlati con l'NO esalato. Su questa base si potrebbe pensare che l'equilibrio acido-base potrebbe influenzare la concentrazione dei metaboliti dell'ossido nitrico nelle vie aeree.

L'analisi dell'espettorato indotto è un metodo riproducibile, valido sensibile e non invasivo per studiare l'infiammazione delle vie aeree. Il metodo consiste nell'indurre l'espettorato tramite l'inalazione di una soluzione salina ipertonica. L'espettorato è successivamente processato, centrifugato e colorato per ottenere alla fine la conta cellulare differenziata [15]. Nel surnatante dell'espettorato possono essere misurati i mediatori dell'infiammazione.

Nell'espettorato, la concentrazione di eosinofili aumenta, in soggetti con asma bronchiale, in seguito all'esposizione ai comuni allergeni ed alla riduzione del trattamento steroideo, mentre diminuisce in seguito a trattamento steroideo [16].

Alcuni studi hanno suggerito che la presenza di eosinofili nell'espettorato può essere un buon segnale della risposta all'inalazione di steroidi [17] e l'incremento di eosinofili nell'espettorato indotto è un buon indicatore in caso di riacutizzazioni di asma [18,19]. Un altro studio suggerisce che cambiamenti nell'espettorato indotto sono correlati con il controllo dell'asma piuttosto che con la severità dell'asma [20]. Ci sono alcune evidenze che questo test possa essere utile nella pratica clinica.

Essendo l'infiammazione eosinofila una caratteristica dell'asma bronchiale è logico considerare la ricerca degli eosinofili nell'espettorato un valido mezzo di valutazione anche dell'asma professionale. La maggior parte degli studi sulle modificazioni dell'infiammazione delle vie aeree in soggetti affetti da asma occupazionale, dopo esposizione in laboratorio ad agenti occupazionali, ha evidenziato eosinofilia dopo l'esposizione. Gli eosinofili nell'espettorato sono aumentati sia dopo esposizione ad agenti ad alto peso molecolare [21,22] che ad agenti a basso peso molecolare come gli isocianati [23], il cedro rosso [24] ed il cianoacrilato [25], mentre diminuiscono in seguito a trattamento steroideo [26]. Comunque ci sono esempi nei quali l'esposizione ad asma occupazionale può indurre prevalentemente neutrofilia nell'espettorato. Un incremento dei neutrofili nell'espettorato è stato osservato prevalentemente dopo esposizione ad isocianati, ma anche dopo esposizione ad altri agenti come a polvere di grano [27]. I fattori che influenzano il tipo di infiammazione delle vie aeree non sono chiari. Uno studio recente ha mostrato che il tipo di reazione asmatica e l'intensità dell'infiammazione indotta da isocianati può essere influenzata dalla concentrazione e dalla durata dell'esposizione a questi agenti [28]. L'asma indotta da isocianati sembra aumentare quando gli isocianati sono utilizzati a basse concentrazioni per lunghi periodi rispetto ad alte concentrazioni per brevi periodi di esposizione. Altri fattori, come il tempo di raccolta dell'espettorato dopo esposizione a isocianati, possono parzialmente spiegare la diversità della risposta infiammatoria negli individui con asma indotta da isocianati. Dopo un'esposizione acuta ad isocianati, i neutrofili potrebbero essere attratti per primi, seguiti dagli eosinofili. E' quindi possibile che alcuni casi di asma siano caratterizzati da un'infiammazione di tipo neutrofilico piuttosto che eosinofilo [29].

Un altro metodo non invasivo ed altamente riproducibile per valutare l'infiammazione delle vie aeree è rappresentato dalla misura dell'ossido nitrico (NO) esalato. Un aumento dei NO esalato è attribuibile all'attivazione della Ossido Nitrico sintetasi inducibile (iNOS) tipicamente iperespressa dalle cellule epiteliali in risposta a citochine pro-infiammatorie, ossidanti e, altri mediatori che accompagnano

l'infiammazione delle vie aeree nell'asma [30,31]. Così come si evince da diversi studi, l'NO esalato nell'asma correla in modo significativo con la percentuale di eosinofili nell'espettorato indotto, con quella rilevata in biopsie bronchiale e/o nel BAL, inducendo come esso rifletta in maniera specifica l'infiammazione eosinofilica [31,32]. Gli eosinofili sono in grado di iperesprimere l'm-RNA per iNOS e quindi possono essere una delle sorgenti di incremento della sua produzione; oltre a ciò, l'aumento della concentrazione di eNO potrebbe a sua volta essere coinvolta nel facilitare la migrazione degli eosinofili nelle vie aeree [31].

La variazione nella concentrazione di NO in risposta a test di provocazione specifici con agenti presenti sul luogo di lavoro, ha prodotto risultati contrastanti in diversi studi. Obata e coll. hanno trovato un incremento nel livello di NO alla 24° ora dopo test di provocazione bronchiale specifico con acido plicatico, agente eziologico dell'asma da cedro rosso, sia nei soggetti con test negativo che in quelli con test positivo, risultando significativo solo nei primi. [24]. Tali risultati differiscono con quanto riportato da Kharitonov e coll. e Allmers e coll. che hanno al contrario rilevato rispettivamente un aumento nei livelli di NO in corrispondenza della risposta asmatica ritardata nei soggetti con asma allergico e in quelli con asma professionale [33,34]. Analogamente Barbinova e coll. hanno rilevato nei soggetti positivi al test di provocazione con isocianati, un significativo aumento di NO alla 22° ora dopo il test [35]. Risultati ancora differenti sono quelli ottenuti nel 2002 da Piipari e coll. che hanno descritto un significativo aumento di eNO in pazienti con livelli di partenza normali o lievemente aumentati di NO (<14,5 ppb) in seguito alla risposta broncoostruttiva ritardata all'agente professionale, ma non in quelli con alti livelli basali di NO.

La ragione per tali discrepanze non è chiara; possono aver influito le differenze metodologiche e/o gli effetti specifici delle diverse sostanze nei test [36]. La concentrazione di NO non aumenta, invece, nei soggetti negativi al test specifico o dopo test con placebo [36].

La perdita di integrità dell'epitelio bronchiale si può associare con alterazioni delle proprietà secretive ed aumento della permeabilità e conseguente rilascio di numerosi mediatori e notevoli quantità di diversi tipi di proteine solubili di basso peso molecolare [3]. Il prelievo di campioni di liquido di rivestimento delle vie aeree, tramite liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL), è il mezzo comunemente utilizzato per studiare tali proteine e le loro possibili variazioni di concentrazione nelle patologie respiratorie. Recenti studi hanno dimostrato inoltre che alcune di esse sono presenti non solo sulla superficie delle vie respiratorie, ma anche e normalmente in piccole quantità nel sangue. In tale modo essendo prevalentemente, se non esclusivamente, secrete nel tratto respiratorio, la loro presenza in circolo può essere spiegata assumendo un loro passaggio dal lume bronchiale a quello vascolare. La determinazione della concentrazione di alcune di tali proteine altamente diffusibili, potrebbe rappresentare un nuovo approccio nella valutazione di esposizioni in acuto o in cronico a tossici respiratori inalati. In normali condizioni, infatti, l'epitelio delle vie aeree, assieme all'endotelio capillare, riduce il passaggio di particelle esogene e macromolecole dal lume aereo nel circolo [37]. L'integrità delle tight junction è considerato infatti come il più importante fattore nell'assicurare le proprietà di barriera dell'epitelio bronchiale, e in condizioni fisiologiche, solo piccole quantità di traccianti introdotti sperimentalmente nella trachea viene poi rilevato nel circolo. Alterazioni anatomiche e funzionali della barriera epiteliale risultano perciò in un'aumentata permeabilità. Tale evento bi-direzionale, consiste nel trasporto sia di componenti serici come l'acqua e le proteine nelle vie aeree, che in un flusso di macromolecole endogene ed esogene dalle vie aeree nel sangue. Studi sperimentali hanno evidenziato che non solo l'esposizione a sostanze tossiche è in grado di aumentare la permeabilità epiteliale, bensì tale incremento si ottiene anche con alterazioni della stessa omeostasi polmonare, quale quella indotta da una riduzione della concentrazione locale del glutathione o la stessa attività fisica [37]. Tali alterazioni, come già detto possono essere rilevate misurando la concentrazione di proteine solubili nel BAL. Tuttavia, a causa dell'invasività, tale metodica risulta

difficilmente applicabile nel monitoraggio di popolazioni esposte a tossici respiratori sia nell'ambiente comune di vita che sul luogo di lavoro. Inoltre, considerando che le proteine presenti nel fluido di rivestimento delle vie aeree attraversano la barriera epiteliale molto lentamente, essa manca anche dell'adeguata sensibilità per monitorare anche solo lievi alterazioni della permeabilità stessa [3].

In accordo con recenti studi nell'uomo e nell'animale da esperimento, l'integrità della barriera epiteliale bronchiale può essere indagata in modo molto meno invasivo tramite il dosaggio nel siero di proteine specifiche prodotte e secrete nelle vie aeree, anche dette "pneumoproteine". Una di queste è rappresentata da una proteina di basso peso molecolare prodotta dalle cellule di Clara e secreta in gran quantità nel lume delle vie respiratorie, la proteina delle cellule di Clara (CC-16) [38].

La produzione di CC-16 da parte delle cellule non ciliate di Clara nell'uomo e nell'animale da esperimento è stata descritta per la prima volta da Singh e coll., nel 1988 [39,40]. Furono identificate solo piccole quantità della proteina nel BAL e si concluse che CC-16 fosse un costituente minore del liquido di rivestimento delle vie aeree. Nel 1992 una nuova proteina urinaria denominata Proteina 1, inizialmente isolata dalle urine di pazienti con disfunzioni tubulari, fu identificata come CC-16 sulla base della sequenza aminoacidica; da allora ne sono state purificate altre in diversi tipi di tessuti, che presentano similarità nella sequenza con CC-16. Studi di immunostochimica hanno rilevato che CC-16 viene prodotta quasi esclusivamente dalle cellule di Clara nei bronchioli terminali. Le cellule non ciliate di Clara sono una delle più eterogenee e multifunzionali cellule presenti nel tratto respiratorio e si localizzano soprattutto nella porzione prossimale e centrale dell'acino polmonare, al limite fra le vie di conduzione e gli spazi alveolari e, la loro funzione è volta principalmente alla protezione del tratto respiratorio [37]. Esse fungono anche da cellule staminali nella riparazione dell'epitelio bronchiale, hanno elevata capacità nella trasformazione degli xenobiotici e secernono numerose sostanze con importanti proprietà biologiche [37]. La CC-16 rappresenta in tal senso il principale prodotto proteico.

CC-16 è costituita da un omodimero di 16 KDa costituito da due catene identiche anti-parallele di 70 amminoacidi, unite da due ponti di solfuro. La sua sequenza amminoacidica presenta un'alta similarità con quella di CC-16 di altre specie di mammiferi (scimmia, roditore), indicando un alto livello di conservazione filogenetica e suggerendo un'importanza dal punto di vista fisiologico. Sia nell'essere umano che nell'animale da esperimento l'm-RNA della proteina si localizza nelle vie aeree (trachea, bronchi e regioni bronchiolari) ma non nell'epitelio alveolare ed è stato inoltre isolato anche da prostata, endometrio, polmone fetale e rene. Il suo esatto ruolo in vivo rimane da chiarire, sebbene vi sia crescente evidenza che giochi un ruolo protettivo contro la risposta pro-infiammatoria nel polmone [39]. Dagli studi in vivo si evince che CC-16 sia dotata di potente attività anti-infiammatoria ed immunosoppressiva. Tali studi hanno infatti dimostrato che è in grado di inibire la chemiotassi e la fagocitosi di monociti e neutrofilo, oltre che di inibire in modo dose-dipendente la chemiotassi dei fibroblasti, effetto questo correlato con il blocco dell'attività citosolica della fosfolipasi A2 (PLA2). Le PLA2 sono una famiglia di esterasi coinvolte in molti processi fisiologici e patologici, fra cui il controllo della produzione dell'acido arachidonico, di prostaglandine e leucotrieni. In tal modo l'inibizione di PLA2 può attenuare la progressione dell'infiammazione, riducendo anche la degradazione dei fosfolipidi costituenti il surfactante e quindi prevenendo lo sviluppo di un disturbo respiratorio cronico. In più, inibendo l'attività secretoria delle PLA2 e così riducendo il livello dell'acido lisofosfatato negli spazi alveolari, CC-16 può indirettamente ridurre l'attivazione di integrine che aumentano la migrazione dei fibroblasti e l'abnorme deposizione tessutale di fibronectina, prevenendo così l'evoluzione cronica dell'infiammazione. Altri studi hanno evidenziato che CC-16 è in grado di inibire in vitro sia la produzione che l'attività dell'INF- $\gamma$ , una potente citochina multifunzionale prodotta nel corso di processi infiammatori nonché di infezioni virali; a sua volta INF- $\gamma$  è in grado di aumentare l'espressione dell'm-RNA di CC-16 nel polmone di topo e, il livello della proteina in colture di cellule epiteliali umane. CC-16 presenta altresì una naturale affinità per la fibronectina, ma il

significato fisiopatologico di questa proprietà è attualmente ancora controverso. Uno studio recente ha avanzato l'ipotesi che per le sue proprietà di legame, la CC16 giochi un ruolo nella regolazione della motilità cellulare e nella migrazione delle cellule cancerose nella matrice extracellulare [37,41]. Studi in vivo nell'animale da esperimento hanno rafforzato l'ipotesi che CC-16 sia coinvolta nella protezione da stress ossidativi e nella modulazione dell'infiammazione polmonare durante infezioni virali. Topi privi della capacità di esprimere la proteina, presentano infatti un'aumentata suscettibilità al danno da fattori inducenti stress ossidativi quali ozono, l'iperossia e agenti chimici come l'ipomeanolo, con incremento significativo di cellule e marker infiammatori a livello bronchiale [41]. L'esposizione sperimentale a tali agenti causa una riduzione numerica delle cellule di Clara con conseguente riduzione dei livelli di CC-16 nel polmone; al contrario la concentrazione sierica di CC-16 tende ad aumentare [41,42]. Da quanto sopra esposto si evince come CC-16 possa rappresentare un nuovo marker di danno epiteliale bronchiale utile per valutare gli effetti acuti o cronici sull'integrità dell'epitelio di vari tossici respiratori [41]. Tale approccio si basa sul concetto, già altrove espresso, che le proteine secretorie dell'apparato respiratorio muovono passivamente attraverso la barriera epiteliale nel siero, ove possono essere dosate quali indicatori indiretti di danno epiteliale. CC-16 nel siero rappresenta, in tal senso, un marker sensibile di aumentata permeabilità della barriera epiteliale o qualora questa sia intatta, una perdita di integrità e/o riduzione numerica delle cellule di Clara si dovrebbe tradurre in una riduzione di CC-16 [41].

Lo sviluppo recente di nuove tecniche di dosaggio immunoenzimatico della proteina ha permesso di rilevare che nel BAL, di soggetti adulti e sani, CC-16 è presente in notevole quantità pari a circa 1-2 mg/L (pari al 2-3% di tutte le proteine solubili contenute nel BAL), rappresentando così una delle più abbondanti proteine secretorie del polmone [40]. La concentrazione misurata con diverse metodiche, varia invece fra 5 e 50 ng/ml [43,44]. Si può notare che diversamente da altre proteine a basso PM la cui concentrazione fluttua all'interno di piccoli intervalli, CC-16 mostra notevoli

variazioni nel siero di soggetti sani, con valori che differiscono di un ordine di grandezza di dieci o più. Attualmente non vi è spiegazione per questa grande variabilità, che può rappresentare una differenza inter-individuale nel passaggio dalle vie aeree al circolo, piuttosto che una differenza numerica nelle cellule di Clara, o di sintesi/secrezione della proteina da parte delle stesse cellule nel tratto respiratorio [40].

Un recente studio di Helleday e coll. ha inoltre evidenziato come la concentrazione di CC-16 nel siero dipenda, analogamente a quella di altri metabolici, da un ritmo circadiano che vede ridursi significativamente la sua concentrazione dalle dieci del mattino alle dieci di sera. Nessuna correlazione è stata identificata invece fra la concentrazione di CC-16 e caratteristiche quali l'età, il sesso o il Body Mass Index (BMI) [45].

Il notevole gradiente di concentrazione fra BAL e siero (dell'ordine di quasi 1000) probabilmente assicura la forza per il passaggio di CC-16 dal polmone al circolo sanguigno, da cui viene poi rapidamente eliminata per opera della clearance renale. Da studi effettuati in animali da esperimento, poi confermati da studi sull'uomo, si evince che l'emivita di CC-16 in circolo a seguito di esposizioni acute di breve durata a tossici, risulta tuttavia molto breve, tale da richiedere che la raccolta del campione di siero venga effettuato immediatamente o poche ore dall'esposizione. Una volta filtrata dal glomerulo CC-16 viene quasi completamente riassorbita a livello tubulare tanto che la qualità escreta risulta essere solo pari all'1%. Come conseguenza, la concentrazione sierica aumenta parallelamente al declino della funzionalità renale [46]. Variazioni della concentrazione della proteina nel BAL e nel siero sono state osservate in pazienti con diverse patologie dell'apparato respiratorio e in soggetti esposti a tossici inalatori.

Nell'uomo un'esposizione acuta ad irritanti respiratori è in grado, allo stesso modo che nell'animale da esperimento, di indurre un aumento di CC-16 nel siero. Tale aumento si accompagna ad una riduzione proporzionale nel liquido di rivestimento

epiteliale e nel tessuto polmonare, quale espressione di aumentata permeabilità della barriera [46,41].

Un aumento transitorio della proteina a seguito di esposizione ad irritanti è stato rilevato in un gruppo di pompieri dopo venti minuti di inalazione di fumo di combustione, ed è stato poi confermato da uno studio riguardante ciclisti esposti ad ozono ambientale durante due ore di esercizio fisico; l'esposizione ad ozono ha dimostrato inoltre un aumento dose-dipendente della permeabilità epiteliale [44].

Analogamente uno studio di Blomberg ha valutato sperimentalmente l'effetto sulla concentrazione sierica di CC-16 dell'esposizione a 2 ppm di ozono in 22 soggetti. I risultati mostrano un incremento significativo della concentrazione della proteina a 2 e 4 ore dopo l'inalazione, con ritorno a valori basali a 18 ore [46].

In un altro studio del 2005, Michel ha studiato l'effetto dell'inalazione di LPS sulla concentrazione sierica di CC-16 in 15 soggetti sani. I risultati hanno confermato i dati di precedenti studi: la proteina tende ad aumentare significativamente la concentrazione in modo dose dipendente dopo 6-8 ore dall'esposizione, fino a tornare entro livelli basali alla 24° ora [47].

La determinazione della proteina, come già accennato, è altresì utile per valutare gli effetti in cronico di un'esposizione ad irritanti respiratori. Una riduzione di CC-16 nel siero di fumatori di entrambi i sessi è stata osservata in diversi studi mostrando una relazione lineare dose-dipendente con decremento di circa il 15% CC-16 per ogni 10 pacchetti/anno di sigarette fumate. La concentrazione risulta essere ridotta in modo dose-dipendente anche nel BAL di soggetti fumatori, effetto legato ad una riduzione numerica delle cellule di Clara CC-16 positive così rilevato da studi di immunoistochimica [40]. Analogamente CC-16 risulta variamente ridotta in concentrazione anche in lavoratori esposti a silice libera cristallina e lavoratori di fonderia, nella BPCO, nel cancro del polmone e nella fibrosi polmonare idiomatica. Dati sperimentali riguardanti l'esposizione a derivati del cloro nelle piscine ribadiscono come l'esposizione reiterata a irritanti respiratori nei frequentatori

assidui, sia in grado di ridurre i livelli circolanti rispetto a soggetti non esposti, ovvero esposti in modo occasionale [48].

Nei Paesi industrializzati l'asma rappresenta oramai una delle più frequenti patologie croniche dell'apparato respiratorio. Il 9-15% di casi di asma nell'adulto risulta correlato al lavoro [49]. L'asma occupazionale è definita come una patologia respiratoria caratterizzata da una limitazione variabile del flusso e/o iperresponsività delle vie aeree e/o da infiammazione dovuta a cause e condizioni attribuibili a particolari ambienti di lavoro e non a stimoli incontrati all'esterno dell'ambiente di lavoro [50]. Gli agenti in grado di causare asma comprendono più di 300 sostanze chimiche naturali e di sintesi ad alto e basso peso molecolare. Fra gli agenti a basso peso molecolare, gli isocianati sono fra i maggiori responsabili di casi di asma di tipo occupazionale, come conseguenza della loro ampia diffusione in molti processi industriali e per le loro caratteristiche chimico-fisico intrinseche [51]. Gli isocianati sono composti chimici caratterizzati da un gruppo isocianico altamente reattivo, in grado di legare atomi di idrogeno di radicali aromatici, alifatici e cicloalifatici [52]. I più comunemente utilizzati sono il toluene diisocianato (TDI), l'esametilen-diisocianato (HDI) ed il metilen-4,4-diisocianato (MDI) [53] e mentre il TDI e l'HDI sono relativamente volatili a temperatura ambiente, l'MDI è solido e sublima se riscaldato [54]. L'esposizione ad isocianati consegue all'inalazione di vapori od aerosols ed è molto varia a seconda del tipo di lavorazione [55]. I settori di maggior utilizzo sono rappresentati dall'industria automobilistica, del mobile e calzaturiera [53]. I monomeri di isocianati menzionati entrano nella produzione di vernici poliuretatiche, smalti, adesivi, schiume rigide e flessibili, elastomeri, materiali isolanti, anime di fonderia e insetticidi [55,53].

Lo spettro di patologie respiratorie croniche che possono essere indotte dagli isocianati include l'asma, l'alveolite allergica estrinseca e la BPCO. Non si conosce ancora il preciso meccanismo che sottende ad un'asma indotta da isocianati, sebbene il meccanismo immunologico rimanga il più probabile [51].

I fattori più importanti coinvolti nell'insorgenza e successiva cronicizzazione sono rappresentati dalla durata totale dell'esposizione, dalla durata dei sintomi prima dell'allontanamento dall'agente sensibilizzante, dal grado di compromissione a livello funzionale, compreso il grado di iperreattività al momento della diagnosi [56]. La diagnosi di asma occupazionale può essere difficile da confermare oggettivamente. Essa si basa su una storia clinica compatibile, sul riscontro di precise alterazioni di tipo funzionale, quali la limitazione variabile del flusso aereo e/o un'iperreattività bronchiale aspecifica e, dalla correlazione con l'attività lavorativa. Il gold standard per una definitiva diagnosi è rappresentato però dal test di provocazione bronchiale con l'agente specifico. La positività al test effettuato con molecole a basso peso molecolare come i diisocianati, è rappresentata da reazioni isolate di tipo immediate (entro la prima ora dall'esposizione) o ritardate (dopo la prima ora dall'esposizione), bifasiche o reazioni atipiche [57].

Di recente, accanto ai comuni test di funzionalità respiratoria, si è diffuso l'utilizzo degli indicatori di infiammazione delle vie aeree precedentemente menzionati. Tali indicatori non sono solo utili nel completamento diagnostico, ma anche per confermare e analizzare il danno secondario a determinate esposizioni lavorative direttamente ove questo viene indotto.

## **SCOPO**

In questo studio si è ipotizzato che la risposta acuta delle vie aeree indotta da isocianati in soggetti sensibilizzati, sia caratterizzata da richiamo di cellule infiammatorie nelle vie aeree, valutabile tramite l'analisi dell'espettorato indotto, da un particolare profilo di mediatori liberati dall'epitelio bronchiale nell'aria esalata (ad esempio NO esalato), da alterazioni del lining fluid quantificabili nel condensato dell'aria espirata misurandone il pH e danno bronchiolare dosando proteine caratteristiche delle vie aeree nel plasma e nelle urine (CC16).

Lo scopo di questo studio è stato quindi quello di confrontare la risposta delle vie aeree all'esposizione sperimentale ad isocianati in soggetti affetti da asma da isocianati rispetto ad un gruppo di controllo, tramite l'uso di metodiche prevalentemente non invasive.

## **MATERIALI E METODI**

### **DISEGNO DELLO STUDIO**

Per questo studio sono stati selezionati 42 soggetti: 15 con asma professionale da isocianati, 24 soggetti di controllo, non sensibilizzati e 3 soggetti con rinite professionale da isocianati. Tutti i soggetti erano esposti professionalmente ad isocianati (TDI, HDI, MDI). I soggetti con asma professionale e quelli con rinite da isocianati presentavano sintomi compatibili all'esposizione lavorativa. I sintomi comprendevano per i primi: dispnea, respiro sibilante, tosse secca, oppressione toracica al lavoro di sera o di notte; mentre per gli altri: starnuti, rinorrea e stenosi nasale.

I soggetti sono stati ricoverati nel nostro reparto per eseguire il test di provocazione bronchiale specifico. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad una dettagliata anamnesi clinica e lavorativa e a test allergometrici cutanei usando il metodo dei prick test con estratti dei comuni allergeni, per valutare l'atopia, intesa come positività cutanea ad uno o più dei comuni allergeni. Tutti i soggetti erano liberi, da almeno 1 mese, da infezioni respiratorie e da terapia cortisonica, per via inalatoria e/o per os, e  $\beta_2$  agonisti a lunga durata d'azione. L'unico farmaco concesso ai pazienti era Salbutamolo da utilizzare al bisogno.

Il ricovero, per ogni paziente, ha avuto una durata di cinque giorni.

Ciascun soggetto è stato valutato per cinque giorni consecutivi e per altre due volte a distanza rispettivamente di sette e trenta giorni dal test di provocazione bronchiale specifico.

Nel primo giorno di ricovero, a ciascun paziente sono stati eseguiti, nell'ordine: la misurazione dell'Ossido nitrico (NO) esalato, preceduto dalla compilazione di un questionario che consentiva di valutare l'idoneità all'esecuzione della misurazione, la raccolta del condensato espirato (EBC), le misurazioni di spirometria completa e

della diffusione del CO, l'induzione dell'espettorato, un prelievo di sangue venoso e la raccolta di un campione di urine.

Nel secondo giorno sono state eseguite le misurazioni dell'NO, la spirometria di base (CV e FEV1) e la raccolta del condensato dell'aria esalata. Successivamente è stato eseguito lo Sham, esposizione a placebo, con monitoraggio di NO esalato, FEV1 a 15 e 30 minuti ed ad ogni ora per 7 ore dopo placebo. Dopo la settima ora è stato raccolto il condensato dell'aria espirata ed è stato eseguito il test di stimolazione bronchiale aspecifico con metacolina.

Nel terzo giorno sono state eseguite la misurazione di NO esalato, la raccolta del condensato e la spirometria di base (CV e FEV1). Successivamente è stato eseguito il test di provocazione bronchiale specifico con monitoraggio di NO esalato e FEV1 a 15 e 30 minuti ed ad ogni ora per 7 ore dopo esposizione ad isocianato. Dopo la settima ora sono stati eseguiti: la raccolta del condensato dell'aria espirata, il test di stimolazione bronchiale aspecifico con metacolina, il prelievo di sangue venoso e la raccolta di un campione di urine.

Nel quarto giorno, corrispondente alla 24<sup>°</sup> ora dopo il test di stimolazione bronchiale specifico, sono state eseguite la misurazione di NO, la raccolta dell'EBC, la spirometria completa, la diffusione del CO; è stato inoltre indotto l'espettorato ed eseguito il prelievo di sangue venoso e la raccolta di un campione di urine.

Nel quarto giorno, corrispondente alla 48<sup>°</sup> ora dopo il test di esposizione bronchiale specifico, sono state eseguite: la misurazione dell' NO esalato, la raccolta dell'EBC e la spirometria di base (CV e FEV1).

Dopo una settimana e a 30 giorni dal test di stimolazione bronchiale specifico, i pazienti sono stati richiamati a controllo e sono state eseguite le misurazioni di NO esalato, la raccolta dell'EBC e la spirometria completa.

## MISURAZIONE DELL'OSSIDO NITRICO ESALATO

L'NO esalato (eNO) è stato misurato per ogni paziente usando un analizzatore a chemiluminescenza (NIOX version 2.0, Aerocrine AB, Solna, Svezia), in grado di registrare in tempo reale i valori dell'eNO che venivano riprodotti in forma di grafico concentrazione/tempo su un monitor collegato all'analizzatore.

L'eNO del paziente è calcolato automaticamente dal software dell'analizzatore al raggiungimento di uno stato di plateau facendo una regressione dell'ultimo 30% della curva (le oscillazioni concesse tra punto massimo e minimo del plateau non devono superare i 5 ppb o il 10%) e viene espresso come concentrazione di eNO frazionato (FeNO) misurato in parti per bilione (ppb).

Il limite di risoluzione dello strumento è di 1 ppb e il tempo di risposta di 200 msec, il range di misurazione va da 0 a 25000 ppb.

La misura è stata eseguita secondo le indicazioni dell'ATS/ERS [58], con il paziente seduto senza l'utilizzo di stringinaso. Dopo un'espiazione massimale ciascun paziente veniva invitato ad inspirare, fino a capacità polmonare totale, aria priva di NO attraverso un boccaglio collegato, tramite un tubo di teflon, all'analizzatore. L'espiazione successiva, della durata di 12 sec, veniva condotta contro una pressione positiva per chiudere il palato molle ed escludere così il contributo delle cavità nasali dall'aria espirata. La pressione di espiazione veniva mantenuta costante dal paziente grazie ad un indicatore di pressione che compariva sul monitor durante l'esecuzione della misura. Questo permetteva di mantenere un flusso espiratorio costante di 50ml/sec per tutta la durata della prova.

L'analizzatore effettua una calibrazione quotidiana automatica con aria priva di NO e viene inoltre calibrato ogni 14 giorni con una miscela gassosa certificata contenente 210 ppb di NO.

## **MISURAZIONE DEL pH NEL CONDENSATO DELL'ARIA ESPIRATA**

La raccolta del condensato dell'aria esalata è stata eseguita facendo respirare il paziente a volume corrente tramite una valvola a due vie, utilizzata come boccaglio e collegata per mezzo di tubi di Tygon al sistema di refrigerazione costituito da una provetta di polietilene (Falcon da 50 ml monouso) munita di tappo con via di entrata e di uscita per il flusso respiratorio. La provetta viene posta nella camera di condensazione costituita da un contenitore termico contenente un sacchetto di gel refrigerante precedentemente congelato a  $-80^{\circ}$  C. Con una serie di misure ripetute sono state identificate le condizioni, di temperatura ( $-55^{\circ}$  C) e durata del periodo di condensazione (15 minuti), che offrono il miglior compromesso tra accettabilità del test da parte del soggetto e volume di fluido disponibile per l'analisi. Dal condensato totale (1-3 ml) è stata raccolta un'aliquota di 200  $\mu$ l per la misura del pH, eseguita grazie ad un pHmetro da banco a microprocessore (pH 300 Hanna Instruments, Italia) con elettrodo di riferimento a base piatta. Prima della misura il campione è stato degassato per 3 minuti con gas inerte (argon) per eliminare l'anidride carbonica e stabilizzare il pH.

## **TEST DI FUNZIONALITÀ RESPIRATORIA**

I volumi polmonari mobilizzabili sono stati misurati secondo le direttive dell'ATS/ERS [59] mediante uno spirometro a secco (PFT Horizon, mod. 922, Sensor Medics, USA). Sono stati utilizzati i valori migliori di capacità vitale forzata (CVF) e di volume espiratorio massimo in un secondo (VEMS) ottenuti da 3 prove effettuate per ogni soggetto; da questi valori è stato poi calcolato il rapporto VEMS/CVF.

E' stato calcolato anche il rapporto CV/CV teorico (CV%) e VEMS/VEMS teorico (VEMS%) utilizzando come valori teorici i valori normali predetti dalla Communauté Européenne du Charbon et de Acier (CECA 71) [60].

## **DIFFUSIONE DEL CO**

La diffusione del CO è stata eseguita con strumento della Biomedin (Italia) attraverso il metodo del respiro singolo, secondo le direttive dell'ATS/ERS [61]. Il paziente eseguiva un'inspirazione eguale alla sua capacità vitale inalando una miscela contenente lo 0,3% di CO e il 10% di elio; trattenendo il respiro per per 10 secondi e poi eseguendo una espirazione. Sono stati scartati i primi 750 cc di gas, per eliminare l'influenza dello spazio morto ed è stato invece raccolto ed analizzato il litro successivo. L'elio indica la diluizione del gas inspirato nell'aria alveolare e, quindi la  $P_{CO}$  alveolare iniziale. Presumendo che il CO durante la pausa respiratoria lasci l'area alveolare in rapporto alla  $P_{CO}$ , la capacità di diffusione viene calcolata come quel volume di CO che viene assorbito per minuto e per ogni mmHg della  $P_{CO}$  alveolare [61].

## **INDUZIONE ED ANALISI DELL'ESPETTORATO**

L'induzione dell'espettorato è stata eseguita subito dopo la misurazione del  $FEV_1$  post-inalazione di Salbutamolo [15]. L'induzione consisteva nel far inalare una soluzione salina ipertonica con un nebulizzatore ultrasonico (Ultra Neb 2000) per periodi di 5 minuti, per un totale di 20 minuti. La concentrazione salina è stata aumentata ad intervalli di 10 minuti dal 3% al 4%. Dopo ogni 5 minuti di aerosol la nebulizzazione era interrotta da una breve pausa durante la quale al paziente veniva chiesto di sciacquare la bocca con acqua. Poi, era invitato a tossire ed espettorare in una capsula di Petri. Per valutare l'eventuale comparsa di broncospasmo, è stato misurato il  $FEV_1$  dopo ogni periodo di inalazione della soluzione salina ipertonica. I frustoli dell'espettorato sono stati selezionati dalla saliva utilizzando una pinzetta con estremità ricurve e sono stati sciolti meccanicamente con una pipetta aggiungendo 1 ml di ditiotreitolo 0.1%. Successivamente il tutto è stato filtrato, attraverso una rete di nylon (luce 52-56  $\mu m$ , Vetrotecnica) precedentemente inumidita con tampone fosfato

(PBS: NaCl 0.12 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+2H<sub>2</sub>O 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM a pH 7.4). Sono stati aggiunti a 10 µl di sospensione cellulare 10 µl di Trypan Blue e si sono analizzati alla camera di Bunker per determinare la conta cellulare. La sospensione cellulare è stata poi centrifugata (Eppendorf centrifuge 5415) a 3000 rpm per 3 minuti) ed il pellet cellulare ottenuto è stato risospeso in PBS e portata ad una concentrazione pari a 300.000 cellule/ml. La vitalità cellulare è stata determinata mediante esclusione del Tripan Blu. La sospensione cellulare è stata citocentrifugata con CYTOSPIN 3 (Thermo Shandon) [15]. Per effettuare la conta differenziale i vetrini sono stati colorati con Diff Quik e sono state contate quattrocento cellule per vetrino in duplicato per ogni soggetto. I risultati delle conte differenziali sono stati espressi come percentuale di cellule nucleate escludendo le cellule epiteliali squamose.

## **DIAGNOSI DI ASMA PROFESSIONALE DA ISOCIANATI**

La diagnosi di asma professionale indotto da isocianati è stata basata sulla presenza dei seguenti criteri [62]:

- Anamnesi suggestiva di asma professionale in presenza di sintomi tipici (episodi di sibili, oppressione toracica, tosse e dispnea) e correlazione temporale dei sintomi con l'esposizione lavorativa (test arresto-ripresa positivo);
- Accertata esposizione lavorativa ad isocianati attraverso la visione delle Schede Tecniche di Sicurezza dei prodotti utilizzati dai pazienti;
- Conferma della presenza di asma bronchiale [63]:  
documentata broncoostruzione con reversibilità spontanea o dopo uso di un farmaco β<sub>2</sub> agonista di almeno il 15% o presenza di iperreattività bronchiale aspecifica (IRBA = PD<sub>20</sub>FEV<sub>1</sub> dopo metacolina: <1.440µg) e/o variabilità quotidiana del picco di flusso (PEF) con delle variazioni giornaliere di almeno il 20%;
- Conferma del ruolo causale dell'agente professionale:  
positività del test di provocazione bronchiale specifico con isocianati.

I pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti a test di provocazione bronchiale specifico con isocianati. In base alla risposta positiva o negativa al test sono stati divisi in: pazienti positivi al test di provocazione bronchiale specifico (SIC-positivi), pazienti negativi al test di provocazione bronchiale specifico (SIC-negativi) e pazienti negativi al test di provocazione bronchiale specifico, ma con manifestazioni di rinite (SIC-negativi-rinitici).

## **TEST DI PROVOCAZIONE BRONCHIALE ASPECIFICO CON METACOLINA**

I soggetti hanno eseguito 5 inalazioni di soluzione tampone fosfato mono-bisodico (PBS) a pH 7,4, alle quali seguiva la misura del VEMS (il migliore dei 3 tracciati respiratori soddisfacenti), per ottenere il valore base del test [64]. Quindi è stata somministrata una soluzione di metacolina in PBS a pH 7,4 a concentrazioni crescenti. Le concentrazioni usate sono state di 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 mg/ml, corrispondenti a dosi cumulative da 22 µg a 1440 µg. Per produrre l'aerosol è stato impiegato un nebulizzatore De Vilbiss 646, collegato a dosimetro di Rosenthal French. Nel nebulizzatore si è posto un volume di 3 ml di soluzione di metacolina (alla concentrazione di 64 mg/ml), alimentato da aria compressa a 50 psi di pressione in uscita. Per ciascuna delle 5 inalazioni venivano nebulizzati  $45 \pm 3$  µl di soluzione. Le particelle avevano un diametro di massa media di 1.2 µm (con deviazione standard geometrica di 2.9 µm). Ognuna delle 5 inalazioni, della durata di 5 secondi ciascuna, è stata seguita da 5 secondi di apnea. Dopo 3 minuti dall'esposizione di ciascuna dose di metacolina, si è misurato il VEMS. La reattività alla metacolina è stata espressa come PD<sub>20</sub>VEMS, cioè come la dose di metacolina in grado di determinare una caduta del VEMS del 20% rispetto alla base.

## **TEST DI PROVOCAZIONE BRONCHIALE SPECIFICO CON ISOCIANATI**

Il test di provocazione bronchiale con isocianati è stato eseguito ponendo ciascun soggetto in una camera di 9 m<sup>3</sup> ed esponendolo per un periodo di 30 minuti a concentrazioni tra 3 e 17 ppb di isocianati. La concentrazione di isocianati nella camera è stata misurata in continuo con un analizzatore (SPM Single Point Monitor, Zellweger Analysis Ltd, UK). I vapori di toluene diisocianato (TDI) e di l'esametilene diisocianato (HDI) sono stati generati nella cabina di esposizione facendo passare un flusso di 2 l/min di aria in una bottiglia di vetro da 200 ml contenente 20 ml di TDI o HDI. Mentre i vapori di metan difenil-diisocianato (MDI) sono stati ottenuti ponendo un campione di 3 ml su di un vetrino d'orologio in un backer di vetro pirex, riempito per circa un terzo del volume con sabbia riscaldata a 200°C. Mantenendo la temperatura della sabbia costante, l'MDI comincia a esalare dopo alcuni minuti e in modo agevole se ne può mantenere la concentrazione costante agendo sull'aspirazione forzata dell'aria in cabina. Per rendere omogenea la distribuzione dell'isocianato nella cabina è stata usata una ventola fissata al soffitto. La temperatura della camera è stata mantenuta stabile attorno ai 24°C. Come indice di risposta broncospastica è stato usato il VEMS, la cui misura è stata eseguita sempre con spirometro a secco immediatamente prima dell'inizio del test, dopo 15 minuti e dopo 30 minuti dall'esposizione e poi ad intervalli regolari di un'ora per 7 ore. Un'ultima misurazione è stata eseguita alla ventiquattresima ora. L'esposizione agli isocianati durava 30 minuti o fino all'insorgenza dei sintomi, se il soggetto sviluppava una reazione di tipo immediato. Il giorno precedente il test di provocazione bronchiale specifico il paziente è stato sottoposto ad una procedura identica senza però che ci fossero isocianati nella camera (Sham).

Si è considerata significativa una caduta maggiore o pari al 20% del VEMS entro la prima ora (risposta immediata), o nelle ore successive (risposta ritardata).

Dopo la settima ora ogni paziente è stato sottoposto ad un test di provocazione bronchiale aspecifico con metacolina.

## **PRELIEVO DI SANGUE VENOSO E RACCOLTA URINE PER IL DOSAGGIO DI CC-16**

Un prelievo di sangue venoso periferico e la raccolta di un campione di urine sono stati raccolti prima ed a distanza di 7 e 24 ore dall'esposizione ad isocianato. Il sangue è stato prelevato utilizzando una provetta di tipo Vacutainer non eparinizzata. Ciascuna provetta è stata mantenuta a temperatura ambiente per almeno 20 minuti e quindi centrifugata a 1400 rpm per 15 minuti; il siero così ottenuto è stato aliquotato e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi come il campione delle urine.

Il dosaggio della CC-16 è stato effettuato utilizzando un kit ELISA (Human Clara Cell Protein ELISA, Biovendor, Germania), specifico per la determinazione quantitativa della CC-16.

I calibratori e i controlli di qualità forniti dal kit così come i campioni di siero e urine da testare di tutti i soggetti sono stati analizzati in duplicato. 100 µl di ogni campione sono stati incubati a temperatura ambiente in micropozzetti della piastra contenenti un anticorpo policlonale di coniglio specifico per la CC-16 umana. Durante l'incubazione la CC-16 viene legata dall'anticorpo immobilizzato presente nei pozzetti della piastra. Dopo un'ora i micropozzetti sono stati sottoposti per tre volte a lavaggio con un tampone fosfato (350 ml per pozzetto) per eliminare il materiale in eccesso non legato all'anticorpo; sono stati quindi aggiunti ad ogni pozzetto 100 µl di una soluzione contenente un anticorpo policlonale specifico per la CC-16 umana coniugato a biotina. La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per un'ora e quindi sottoposta a tre lavaggi al fine di rimuovere il materiale in eccesso non legato. La quantità di CC-16 legata al secondo anticorpo è stata determinata tramite l'aggiunta di 100 µl di una perossidasi coniugata a streptavidina e al termine dell'ulteriore ora di incubazione e dei lavaggi, il rimanente coniugato è stato fatto reagire enzimaticamente con 100 µl di soluzione contenente un substrato di perossido d'idrogeno ed una soluzione tamponata di tetrametilbenzidina al fine di ottenere la reazione colorimetrica. La reazione è stata quindi bloccata dopo 10 minuti con

l'aggiunta di una soluzione acida e l'assorbanza del prodotto giallo risultante è stata misurata a 450 nm mediante Microplate Reader (BIORAD) ottenendo così i valori di assorbanza per ciascun campione analizzato. Una curva standard è stata costruita rappresentando graficamente i valori di assorbanza verso le concentrazioni di CC16 (100, 40, 20, 10,5 e 2 ng/ml) dei calibratori. Le concentrazioni dei campioni dei soggetti sono state determinate usando questa curva.

I valori di concentrazione di CC-16 nel siero sono espressi in ng/ml, quelli nelle urine sono stati corretti per il valore della concentrazione di creatinina urinaria e quindi espressi come  $\mu\text{g}$  di CC-16 per mg di creatinina.

## **ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati espressi come media ed errore standard (ES) o mediana e range interquartile o media geometrica ed errore standard. Per le variabili non parametriche le differenze tra i gruppi sono state analizzate usando il test U Mann-Whitney, mentre le differenze all'interno di uno stesso gruppo sono state analizzate con il test di Wilcoxon. Per le variabili parametriche, FEV<sub>1</sub> ed eNO, quest'ultima considerata a distribuzione normale se espressa in logaritmo [65], è stato utilizzato il t Test per dati appaiati. Per confrontare le variabili nominali (sesso, storia di fumo ed atopia) è stato utilizzato il Test Chi Quadro. Il test di Spearman Correlation è stato usato per esaminare l'associazione tra i vari parametri. In caso di misure ripetute è stata applicata la Correzione di Bonferroni e considerando la  $p=0,05$  e le misure ripetute uguali a 12 si è ottenuta una  $p$  corretta ( $p_c$ )  $< 0,004$ . Sono state effettuate almeno tre letture ripetute, per i vetrini dell'espettorato indotto, dallo stesso osservatore in 10 vetrini selezionati casualmente per determinare la riproducibilità "intraobserver". Valori di probabilità minori o uguali a 0,05 sono stati accettati come significativi.

## RISULTATI

In questo studio sono stati esaminati 42 soggetti esposti professionalmente ad isocianati, 15 con asma professionale confrontati con 24 soggetti di controllo senza asma professionale; inoltre sono stati inclusi nello studio 3 soggetti sensibilizzati ad isocianati con rinite professionale ma senza asma.

I soggetti con asma professionale ed il gruppo di controllo erano omogenei per distribuzione del sesso, età, mentre differivano in maniera significativa per l'abitudine al fumo ( $p=0,009$ ) e l'atopia ( $p=0,0046$ ); 3 dei soggetti con asma professionale sono risultati atopici, contro 16 del gruppo di controllo. I due gruppi risultavano omogenei per durata di esposizione lavorativa, tempo trascorso dall'ultima esposizione lavorativa e tipo di isocianato testato. Erano stati esposti, durante l'esposizione al test di provocazione bronchiale specifico, ad una concentrazione di isocianati compresa tra 3 e 17 ppb (Tab. 1). Fra i soggetti con asma professionale, nel giorno di esposizione al test di provocazione bronchiale specifico con isocianati, tutti hanno presentato broncospasmo e quindi sono risultati positivi al test e per questo denominati con la sigla SIC-positivi. Quattro soggetti hanno presentato una reazione asmatica immediata, 5 ritardata e 6 dual. Nessuno dei soggetti di controllo ha presentato reazione asmatica nel giorno di esposizione ad isocianati e per questo sono stati chiamati SIC-negativi (Tab. 1).

I soggetti con rinite da isocianati avevano un età media di  $37\pm 7$  (Media $\pm$ ES) anni, erano tutti atopici, 1 era fumatore e 2 non fumatori. La durata di esposizione professionale a isocianati era di  $13,3\pm 10,9$  (Media $\pm$ SE) anni e l'intervallo dall'ultima esposizione ad isocianati era di  $8\pm 6,5$  (Media $\pm$ ES) giorni. I tipi di isocianati testati sono stati MDI in un soggetto ed HDI in 2. Dopo il test di provocazione bronchiale specifico nessuno soggetto ha presentato reazione asmatica, bensì rinite e, per questo sono stati chiamati SIC-negativi-rinitici (Tab.1).

Nella Tabella 2 sono riportati i dati di funzionalità respiratoria dei soggetti SIC-positivi e SIC-negativi prima dell'esposizione ad isocianati. L'unica differenza

statisticamente significativa è rappresentata dalla PD<sub>20</sub> FEV<sub>1</sub> metacolina (μg) in condizioni basali, che risultava nei SIC-positivi più bassa rispetto a quella dei SIC-negativi. Inoltre il numero dei soggetti con ipereattività bronchiale aspecifica risultava pari a 12 nel gruppo dei SIC-positivi e pari a 7 in quello dei negativi. Nella stessa tabella sono inoltre rappresentati i dati funzionali dei soggetti SIC-negativi-rinitici, dei quali 2 avevano ipereattività bronchiale aspecifica (Tab. 2).

In tabella 3 sono indicati i valori di FEV<sub>1</sub> (ml) nei SIC-positivi, SIC-negativi e SIC-negativi rinitici prima e dopo l'esposizione a placebo. In tutti i 3 gruppi di soggetti non è stata osservata alcuna variazione significativa dopo esposizione a placebo rispetto al valore base.

Nella tabella 4a e 4b sono rappresentati i valori del FEV<sub>1</sub> (ml), nel giorno di esposizione ad isocianati, dei 3 gruppi. Nel gruppo dei SIC-positivi è stato osservato una riduzione significativa del FEV<sub>1</sub> a partire dai 30 minuti dopo l'esposizione ( $p < 0,0001$ ) fino alla 7° ora dopo esposizione ( $p < 0,0001$ ). Il massimo decremento significativo del FEV<sub>1</sub> è stato osservato dopo 30 minuti, 2, 5, 6 e 7 ore dopo esposizione ( $p < 0,0001$ ), in corrispondenza rispettivamente della reazione asmatica immediata e ritardata. Alla 24° ora i valori erano tornati a base (Figura 1). I valori di FEV<sub>1</sub> raccolti alla 48° ora ed a 7 giorni sono relativi a 12 dei 15 soggetti SIC-positivi, mentre i valori al 30° giorno sono relativi ad 11 soggetti.

Nei soggetti SIC-negativi non è stata osservata alcuna variazione significativa dopo esposizione ad isocianati rispetto al valore di base, tranne al 30° giorno dopo esposizione dove si è determinata una  $p = 0,0002$  (Tab 4a e 4b, Fig. 1). I valori di FEV<sub>1</sub> raccolti a 7 giorni sono relativi a 22 dei 24 soggetti SIC-negativi, mentre i valori al 30° giorno sono relativi a 16 soggetti.

I valori di FEV<sub>1</sub> dei SIC-negativi-rinitici raccolti prima e dopo esposizione ad isocianati, fino a 30 giorni dopo l'esposizione sono simili a quelli dei SIC-negativi (Tab 4a e 4b).

Nelle tabelle 5a e 5b sono rappresentate le medesime variazioni del FEV<sub>1</sub> nei 3 gruppi di soggetti, nel giorno di esposizione ad isocianati ed a distanza di 24 e 48 ore

e dopo 7 e 30 giorni dal test espresso come percentuale rispetto al valore di base misurato al tempo 0 (pre-esposizione).

In tabella 6 vengono descritti i dati relativi alla diffusione del CO, nei 3 gruppi di pazienti, espressi in percentuale del predetto, prima ed a distanza di 24 ore dal test. Nei SIC-negativi si osserva una riduzione significativa della diffusione del CO a distanza di 24 ore dal test ( $p < 0,05$ ).

Nella tabella 7 ed in figura 2 sono rappresentate le variazioni della concentrazione di NO esalato (ppb) espresse come media geometrica(ES) durante l'esposizione a placebo nei 3 gruppi. Nei SIC-positivi e SIC-negativi non si osserva alcuna variazione significativa nelle ore successive all'esposizione, da 30 minuti fino alla 7° ora, rispetto al valore di base. I valori di NO esalato dei SIC-negativi sono relativi a 23 pazienti. Per quanto riguarda i SIC-negativi-rinitici l'andamento dell'NO esalato è stabile prima e dopo l'esposizione a placebo fino a 7 ore dopo esposizione.

Nelle tabelle 8a ed 8b ed in figura 3 sono riportati i valori di NO esalato in ppb [media geometrica(ES)] nei tre gruppi di soggetti nel giorno di esecuzione al test di provocazione bronchiale specifico. Nei SIC-positivi l'andamento dell'NO esalato mostra un decremento significativo, rispetto al valore pre-esposizione, a 30 minuti, 2 e 3 ore dopo esposizione ( $p_c < 0,004$ ) ed un incremento significativo, sempre rispetto al valore pre-esposizione, alla 24° e 48° ora dopo esposizione ad isocianato. Il picco massimo viene raggiunto alla 48° ora dopo esposizione ( $p_c < 0,004$ ). In seguito si osserva un lento decremento a 7 e 30 giorni dal test. I valori di NO esalato nei SIC-positivi alla 48° ora dopo esposizione sono relativi a 12 soggetti, quelli al 7° e 30° giorno rispettivamente a 10 e 9 soggetti. Nei SIC-negativi non si è osservata alcuna variazione significativa della concentrazione dell'NO esalato durante l'esposizione ad isocianati. I valori di NO esalato di questo gruppo al 7° e 30° giorno dopo esposizione sono relativi rispettivamente a 22 e 16 soggetti. Nei SIC-negativi-rinitici l'NO esalato si è mantenuto stabile prima e dopo esposizione ad isocianati fino al 30° giorno dopo esposizione (Fig. 3).

In tabella 9 e nelle figure 4 e 5, sono riportate le percentuali di eosinofili e neutrofilo pre e 24 ore dopo esposizione ad isocianati nei SIC-positivi e SIC-negativi. L'espettorato è stato raccolto in 12 SIC-positivi ed in 15 SIC-negativi. Nei SIC-positivi si ha un incremento significativo della percentuale di eosinofili ( $p=0,01$ ) 24 ore dopo esposizione ad isocianati, mentre nei SIC-negativi si osserva una riduzione significativa ( $p=0,04$ ), è inoltre evidente una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi a 24 ore dopo esposizione ( $p=0,0002$ ) e non pre-esposizione, (tabella 9 e figura 4). Per quanto riguarda la percentuale di neutrofilo non si osservano variazioni significative in entrambi i gruppi dopo esposizione ad isocianati (tabella 9 e figura 5).

La tabella 10 mostra i valori di pH del condensato dell'aria espirata di 10 soggetti SIC-positivi e 19 soggetti SIC-negativi, in condizioni basali e 7 ore dopo esposizione a placebo ed ad isocianati. Sia i SIC-positivi che i SIC-negativi hanno mostrato un aumento significativo del pH del condensato raccolto alla 7<sup>o</sup> ora, nel pomeriggio alle ore 16 del giorno dell'esposizione a placebo, rispetto a quello raccolto al mattino prima dell'esposizione. Inoltre non sono state trovate differenze significative fra i due gruppi (figura 6). Per quanto riguarda i valori di pH del condensato, raccolti prima e 7 ore dopo esposizione ad isocianati, è stato mantenuto lo stesso trend in entrambi i gruppi, anche se la differenza non era significativa (figura 7).

Nella tabella 11 e in figura 8 sono riportate le concentrazioni di CC16 nel siero, espressa in ng/ml, dei SIC-positivi e SIC-negativi in condizioni basali ed a 7 e 24 ore dopo il test di provocazione bronchiale specifico. I valori sono relativi a 8 SIC-positivi e a 15 SIC-negativi. La concentrazione media di CC16 nel siero dei SIC-positivi in condizioni basali è più elevata rispetto a quella dei SIC-negativi, presentando una differenza significativa pari a  $p=0,003$ . Alla 7<sup>o</sup> ora dopo esposizione è stato osservato in entrambi i gruppi un lieve trend non significativo di incremento. Alla 24<sup>o</sup> ora dopo esposizione in entrambi i gruppi i valori si sono ridotti al di sotto di quelli basali senza mostrare differenza significativa. La concentrazione media, in condizioni basali, di CC16 nelle urine è risultata significativamente più alta nei SIC-

positivi rispetto ai SIC-negativi ( $p=0,017$ ). Dopo 7 ore dall'esposizione ad isocianati si è osservato un lieve aumento non significativo di CC16 nelle urine dei SIC-negativi, che si è mantenuto tale fino alla 24° ora dopo esposizione. Nei SIC-positivi non si è osservata alcuna variazione (Tabella 12 e figura 9).

Nessuna relazione significativa è stata osservata tra eNO e pH nel condensato dell'aria espirata.

Raggruppando i SIC-positivi e SIC-negativi è stata osservata una correlazione positiva tra la variazione dell'NO esalato, espresso in logaritmo, alla 48° ora dopo esposizione ad isocianati il rispetto al valore pre-esposizione e, la variazione degli eosinofili, espressa in logaritmo, 24 ore dopo esposizione rispetto al valore base ( $p<0,05$ ,  $\rho= 0,496$ ).

## DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo dimostrato che la reazione asmatica indotta da isocianati si associa ad un incremento significativo della concentrazione di eNO che raggiunge il massimo valore alla 48° ora dopo esposizione. Tale aumento è relativamente tardivo perché si evidenzia quando la broncoostruzione si è risolta e risulta sfasato di circa 24 ore rispetto all'aumento degli eosinofili nell'espettorato che in precedenti studi, eseguiti dal nostro gruppo, hanno mostrato incrementi tra l'8° e la 24° ora e ritorno a valori basali dopo 48 ore [23]. Inoltre l'aumento degli eosinofili sembra predire l'aumento dell'ossido nitrico e questo conferma che, nell'asma professionale da isocianati, l'eNO riflette l'eosinofilia delle vie aeree, come già dimostrato da Piacentini e coll. in un gruppo di 25 bambini asmatici [66].

In questo studio è stata osservata una riduzione significativa dell'eNO, durante la reazione asmatica immediata e quella tardiva. L'aumento dell'eNO risulta significativo alla 24° ora dall'esposizione. E' possibile però che l'incremento di eNO cominci prima ma sia mascherato dalla broncoostruzione delle vie aeree. Infatti con la broncoostruzione si ha una riduzione del volume dello spazio morto delle vie aeree e, visto che le nostre misure sono eseguite a flusso costante di 0,05L/s' [58], il tempo di permanenza del bolo esalato nelle vie aeree risulta inferiore; è verosimile quindi che vi sia un minor accumulo dell'eNO nell'aria espirata. Quindi è possibile che vi sia una sottostima della concentrazione dell'eNO in presenza di broncoostruzione delle vie aeree. Questa interpretazione concorda con i risultati di un nostro precedente studio che ha evidenziato la correlazione tra la concentrazione di NO esalato con il volume dello spazio morto[65].

L'aumento di eosinofili nell'espettorato e l'aumento tardivo dell'eNO esalato sono specifici dei soggetti che sviluppano reazione asmatica perché tali cambiamenti non sono stati osservati né nei soggetti di controllo, né in quelli sensibilizzati ad isocianati che sviluppano rinite. Nessuna significativa variazione è stata rilevata per i neutrofili

nell'espettorato, rispetto ad alcuni studi nei quali l'esposizione ad agenti occupazionali si associava a neutrofilia nell'espettorato indotto [67, 28].

Nello studio di Obata H. e coll. [24] si è valutata la combinazione tra eNO ed eosinofilia delle vie aeree prima e dopo esposizione ad acido plicatico, presente nel cedro rosso. A 6 e 24 ore dopo test è stato osservato un incremento significativo degli eosinofili nell'espettorato, fra i soggetti positivi, che era inversamente proporzionale alla caduta del FEV1 alla 6a ora. Un incremento di eosinofili si è osservato anche in tre soggetti negativi al test. E' stato inoltre osservato un incremento significativo dell'eNO alla 24° ora dopo esposizione, tempo massimo di osservazione dei soggetti, ma solo nei soggetti negativi al test. E' stata inoltre trovata una correlazione significativa tra i livelli di eNO ed eosinofili nell'espettorato indotto prima e dopo test di provocazione bronchiale specifico. Nel nostro studio si è osservata una correlazione significativa tra la variazione dell'eNO alla 48° ora rispetto al valore di base e la variazione degli eosinofili 24 ore dopo esposizione rispetto al valore di base, evidenziando così che l'aumento degli eosinofili sembra predire l'aumento dell'ossido nitrico.

Piipari R. e coll. [36] si sono occupati di valutare le variazioni di NO esalato durante test di stimolazione bronchiale specifico. A differenza del nostro studio dove sono stati testati solo isocianati, sono stati utilizzati diversi agenti responsabili di asma professionale: isocianati, *Aspergillus fumigatus*, polvere di legno, lattice, anidridi acide. Le misurazioni di NO esalato sono state eseguite prima e 24 ore dopo test di stimolazione bronchiale specifico. Nei pazienti con broncoostruzione tardiva, con livelli basali di NO normali o lievemente aumentati (<14,5 ppb), è stato osservato un incremento significativo di NO esalato. Mentre i pazienti con livelli basali elevati di NO e broncoostruzione significativa, non hanno mostrato significativi aumenti di NO. Nessun aumento significativo di NO è stato osservato nei soggetti risultati negativi al test specifico, come è stato evidenziato anche nel nostro studio.

Barbinova e coll. hanno rilevato, in soggetti sensibilizzati ad isocianati ed in soggetti non sensibilizzati ma con iperreattività bronchiale aspecifica, un aumento

significativo di eNO alla 22° ora dopo il test di provocazione bronchiale specifico con isocianati [35]. Le discrepanze fra i vari studi che hanno valutato l'eNO ed il nostro studio possono essere dovute a diversi fattori: uso di modelli di asma differenti con eziologia diversa, diversi time-points di misurazione dell'eNO. Inoltre nello studio di Piipari R. e coll. [36] i diversi aumenti di eNO nei soggetti positivi al test specifico potrebbero essere dovuti ad una non adeguata standardizzazione dell'esposizione all'asmogeno professionale. Infatti gli elevati valori basali di eNO, dei soggetti positivi al test che non hanno mostrato variazioni significative, potrebbero essere dovuti ad una recente esposizione lavorativa e questo potrebbe aver mascherato un incremento dell'eNO dopo test specifico. I nostri pazienti, invece, presentavano un intervallo dall'ultima esposizione lavorativa pari ad un valore di  $81 \pm 30$  (medio  $\pm$  ES) giorni nei SIC-positivi e di  $402 \pm 232$  giorni nei SIC-negativi. Il nostro studio, inoltre, è l'unico che ha dimostrato uno specifico incremento di eNO, dopo test di provocazione bronchiale specifico, solo nei soggetti positivi al test di provocazione bronchiale specifico.

In questo studio abbiamo inoltre voluto confrontare l'andamento dell'eNO in tre soggetti con test di provocazione bronchiale specifico ad isocianati negativo, ma affetti da rinite da isocianati (SIC-negativi-rinitici), con i SIC-positivi e SIC-negativi. In letteratura non sono stati trovati studi che si sono occupati del monitoraggio dell'eNO in soggetti affetti da rinite da isocianati. Nei SIC-negativi-rinitici non è stato osservata alcuna variazione prima e dopo esposizione sia a placebo che ad isocianati sia per quanto riguarda i valori di FEV1 che di eNO. Abbiamo quindi potuto osservare che i SIC-negativi-rinitici sembra abbiano un comportamento simile ai SIC-negativi e questo potrà essere confermato, in un prossimo studio, aumentando la numerosità del campione dei SIC-negativi-rinitici.

In questo studio, inoltre, non è stata trovata alcuna variazione del pH nel condensato esalato in relazione all'esposizione ad isocianati né alcuna relazione tra pH e gli altri indici non invasivi di infiammazione delle vie aeree valutati. Non abbiamo potuto quindi confermare quanto osservato da Kostikas e coll. [10] che i valori di pH in

adulti asmatici sono più acidi rispetto a quelli dei controllo sani e che questi correlano con le cellule infiammatorie dell'espettorato indotto. Anche Hunt e coll [9] hanno osservato che il pH del condensato esalato è più basso in soggetti con asma riacutizzata e si normalizza con terapia steroidea. Questi ultimi autori hanno inoltre dimostrato che a bassi valori di pH il nitrato endogeno delle vie aeree è convertito in ossido nitrico in quantità sufficiente da spiegare in gran parte la concentrazione di NO esalato nei soggetti asmatici. Diversamente noi non abbiamo trovato alcuna relazione significativa tra NO esalato e pH nel condensato dell'aria espirata. Tuttavia abbiamo dimostrato un aumento significativo del pH in entrambi i gruppi, soggetti con asma da isocianati e soggetti di controllo, nel giorno di esposizione a placebo, nel pomeriggio (7° ora dopo esposizione) rispetto alla misurazione pre-esposizione eseguita al mattino. Lo stesso trend è stato osservato anche nel giorno di esposizione ad isocianati senza mostrare differenza significativa. Tale andamento del pH in entrambi i gruppi ed in entrambi i giorni suggerisce che il pH del condensato espirato abbia un ritmo circadiano, ma non sappiamo se l'aumento non significativo nel pomeriggio del giorno di esposizione ad isocianati sia da attribuire a tali sostanze.

Per quanto riguarda il dosaggio della CC16 nel sangue e nelle urine è stato confermato con questo studio che la proteina è dosabile nel siero e nelle urine e, che la concentrazione rilevata nel siero è maggiore di quella urinaria. I dati da noi presentati risultano inoltre simili a quelli riportati in letteratura [43, 44].

Nel nostro studio i SIC-positivi presentavano una concentrazione di CC-16 nel siero significativamente più elevata rispetto a quella dei SIC-negativi in condizioni basali, così come risultava più elevata la stessa concentrazione di CC-16 nelle urine. Questo suggerisce che nell'asma ci sia un'alterazione dell'epitelio bronchiolare in condizioni di base.

La bassa concentrazione di CC-16 rilevata nelle urine dei due gruppi di soggetti riflette la nota scarsa escrezione renale della proteina [46]. In un recente studio di Andersson [68] è stato dimostrato che l'escrezione di CC16 urinaria aumenta durante la giornata di circa 0,20µg/ora e alla sera di 0,08/ora. Inoltre negli uomini i livelli di

CC16 sono più elevati perché tale proteina viene prodotta anche a livello prostatico. In questo studio si è quindi osservato che l'esposizione acuta ad isocianati non comporta variazioni significative della CC16 sia nel siero che nelle urine. Non risultano in letteratura pubblicazioni riguardanti la valutazione del danno polmonare acuto e cronico indotto da esposizione professionale ad isocianati, né ad altre sostanze a basso peso molecolare, valutate tramite il dosaggio di CC-16 nel siero e nelle urine. Gli studi valutati finora fanno riferimento alla concentrazione della proteina CC-16 nel BAL e nel siero di soggetti atopici affetti da asma bronchiale di natura allergica, e come tale differente dall'asma da isocianati in cui si riconosce accanto ad una patogenesi di tipo immunologico anche il concorso di fattori di natura irritativa [69]. I valori di CC-16 in soggetti affetti da asma allergico risultano mediamente più bassi nel BAL rispetto a quelli dei controlli sani [70]. Già nel 1999 Shijubo aveva studiato l'andamento della concentrazione sierica di CC-16 in 63 soggetti adulti non fumatori affetti da asma cronico persistente, con 64 soggetti sani non fumatori. Il test ELISA mostrava livelli di CC-16 nel siero degli asmatici significativamente più bassi senza alcuna differenza fra soggetti atopici e non. Le concentrazioni nel caso di malattia di lunga durata, maggiore di dieci anni, risultavano inoltre più basse di quelle con breve durata, minore di dieci anni [39]. Tali risultati confermano quanto determinato da Van Vyve e coll. [70]. Anche in questo caso venivano riportati ridotti livelli di CC-16 nel BAL di soggetti asmatici non fumatori. In un altro studio del 2000, l'analisi della concentrazione di CC-16 nel BAL di 8 soggetti affetti da asma allergico stagionale prima e dopo test di provocazione con basse dosi di allergene, ha evidenziato una riduzione dei livelli della proteina e parallelamente un numero ridotto di cellule CC-16 positive nelle biopsie bronchiali rispetto ai soggetti sani [71]. Gioldassi e coll. nel 2003 ha concluso che la reazione allergica si associa in fase iniziale con una riduzione dei livelli polmonari di CC-16 nei soggetti asmatici, che può a sua volta indurre una riduzione nell'attività anti-infiammatoria contribuendo così al successivo sviluppo della malattia. I ridotti livelli di CC-16 nel siero conseguirebbero, in tal modo, ad una

riduzione delle cellule di Clara. I risultati di questo studio caso-controllo, effettuato su un gruppo di soggetti da 0 a 14 anni e 27 soggetti sani, ha riportato valori medi di CC-16 significativamente inferiori negli asmatici rispetto ai soggetti sani [72]. Solamente Martin, in una recente pubblicazione, ha evidenziato un incremento di CC-16 sierica in concomitanza ad un'esacerbazione asmatica [73]. Diversi autori hanno descritto che l'esposizione acuta ad irritanti per via respiratoria si accompagna ad un incremento significativo nella concentrazione sierica di CC-16 poche ore dopo l'esposizione stessa. Uno studio di Blomberg e coll. ha valutato l'effetto di un'esposizione controllata a ozono, noto irritante delle vie aeree, sulla concentrazione sierica di CC-16 in un gruppo di 22 soggetti sani non fumatori [74]. I soggetti sono stati esposti in due diverse occasioni ad inalazione rispettivamente di ozono ed aria filtrata per una durata di due ore ciascuna. I risultati evidenziano che l'esposizione ad ozono aumenta la concentrazione sierica di CC-16 alla 2° ora ed alla 4° ora dopo inalazione per tornare a livelli basali a 18 ore [74]. Tali risultati concordano con quelli di uno studio di Broeckert del 1999, che aveva valutato la sensibilità di CC-16 nel siero quale marker di espressione di danno epiteliale in un gruppo di ciclisti esposti ad ozono ambientale. L'esposizione ad ozono induce a distanza di due ore dall'inizio dell'attività fisica un aumento significativo dose-dipendente nella concentrazione della proteina a livelli inferiori a quelli raccomandati dalle linee guida sulla qualità dell'aria [40]. Recentemente è stato pubblicato un interessante studio di Michel e coll. che si è occupato di valutare le variazioni nella concentrazione di CC-16 e, la relativa curva dose-risposta, nel plasma di 15 soggetti sani adulti non fumatori dopo esposizione controllata a lipopolisaccaride (LPS), derivato dell'endotossina prodotta dai batteri gram-negativi e loro potente costituente proinfiammatorio. I risultati mostrano che l'inalazione di 50 µl di LPS induce un significativo incremento di CC-16 dopo 6 ore dall'esposizione che si normalizza in 24 ore. L'aumento nella concentrazione della proteina risulta inoltre dose-correlata. Non è stata infatti riscontrata alcuna variazione per esposizioni a LPS pari a 0,5 µg, che rappresenterebbe quindi la dose soglia di tale effetto [46]. Esposizione analoga a

LPS era stata già studiata nell'animale da esperimento con concentrazioni di molto superiori pari a 100 µg/100 gr PC (Peso Corporeo). Tale esposizione si accompagnava però alla comparsa di un picco di concentrazione di CC-16 tre ore dopo l'instillazione di LPS nel siero con ritorno a valori basali dopo ben 36 ore [75]. Questi dati sembrano quindi confermare l'importanza della dose nell'induzione di un danno epiteliale acuto. Nelle nostre condizioni sperimentali le concentrazioni di isocianati utilizzate sono inferiori al TLV (Valori limiti di soglia) e tali probabilmente, da non essere in grado di indurre in breve tempo un danno epiteliale sufficiente, non solo nei soggetti non sensibilizzati, ma anche in quelli più suscettibili con diagnosi di asma professionale. Tali risultati confermano quindi come l'esposizione controllata di trenta minuti ad isocianato durante test di provocazione, a concentrazioni inferiori al TLV, non inducano danno polmonare. Inoltre il prelievo di siero e urine per la determinazione di CC-16 al termine del test, è stato effettuato dopo 7 ore e a breve distanza dalla reazione asmatica di tipo ritardato, ma non a breve distanza dall'esposizione come riportato in letteratura. Essendo infatti il time course di CC-16 nel siero, caratterizzato da un picco a 2-3 ore dall'esposizione all'irritante, questo può aver influito nella concentrazione da noi rilevata. Fra i vari fattori confondenti responsabili del marcato incremento nei soggetti sensibilizzati dopo esposizione ad isocianati, vi potrebbe essere la variabilità circadiana della concentrazione sierica di CC-16. Uno studio di recente pubblicazione ha infatti messo in evidenza una significativa differenza nella concentrazione giornaliera di CC-16, nel siero di 18 soggetti sani non fumatori esposti ad aria filtrata. I risultati mostrano un significativo decremento a partire dalla tarda mattinata fino a sera superiore a 2,5 ng/ml [45]. Nel nostro studio tale variazione si sarebbe potuta rilevare nei soggetti negativi al test, ma le concentrazioni rilevate al mattino e sette ore dopo esposizione ad isocianati non hanno mostrato differenze. Poco si conosce anche riguardo alla variabilità intra-individuale della concentrazione di CC-16 che, secondo Blomberg, a volte può essere superiore a quella indotta dalla stessa esposizione a tossici inalatori [74]. Per poter eliminare tali bias sarebbe stato necessario effettuare il dosaggio di

CC-16 prima e a distanza di sette ore dall'esposizione a placebo, ma tale analisi esulava dallo scopo del nostro studio.

Infine tra i soggetti dello studio l'atopia è risultata più frequente nei soggetti che non hanno risposto al test di provocazione bronchiale specifico con isocianati rispetto a quelli positivi al test, affetti da asma professionale. Questa conferma l'ipotesi già sostenuta da Mapp e coll. [48] che la patogenesi dell'asma indotta da isocianati non è di tipo IgE mediato. I soggetti atopici e negativi al test erano probabilmente affetti da asma bronchiale allergico e questo è ulteriormente confermato dalla riduzione significativa del FEV1 30 giorni dopo esposizione ad isocianati nei soggetti negativi, per una loro riacutizzazione asmatica dovuta a probabile esposizione ad allergeni dopo test specifico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxon HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2645-53.
2. Holtzman MJ, Agapov E, Kim J, Morton JD. Developing the epithelial, viral, and allergic paradigm for asthma. *Chest* 2003; 123:377s-384s.
3. Knight DA, Volgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 2003; 8: 432-446.
4. Jorens PG, Sibille Y, Goulding NJ, Van Overveld FJ, Herman AG, Bossaert L, Backer WA, Lauwerys R, Flower RJ, Bernard A. Potential role of Clara cell protein, an endogenous phospholipase A2 inhibitor, in acute lung injury. *Eur Respir J*, 1995; 8: 1647-1653.
5. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. *Eur Respir J* 1997; 10: 1683-93.
6. Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for non invasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 28-34.
7. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. ATS/ERS task force on exhaled breath condensate. *Eur Respir J* 2005; 26:523-548.
8. Accordino R, Visentin A, Bordin A, Ferrazzoni S, Marian E, Rizzato F, Canova C, Venturini R, Maestrelli P. Long-term repeatability of exhaled breath condensate pH in asthma. *Respir Med* 2007 Nov 29 (Epub ahead of print).
9. Hunt J, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA et al. Endogenous airway acidification. Implication for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:694-699.
10. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit* 2002; 165:1364-1370.

11. Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L1067-L1082.
12. Hunt JF, Erwin E, Palmer L, Vaughan J, Malhotra N, Platts-Mills et al. Expression and activity of pH-regulatory glutaminase in the human airway. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:685-687.
13. Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodelling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 1041-1053.
14. Carraro S, Folesani G, Corradi M, Zanconato S, Gaston B, Baraldi E. Acid-base equilibrium in exhaled breath condensate of allergic asthmatic children. *Allergy* 2005; 60:476-481.
15. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargreave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J*, September 2002, Volume 20, Supplement 37
16. Lemière C. The use of sputum eosinophils in the evaluation of occupational asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:81-85.
17. Pavord ID, Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet* 1999; 353:2213-2214.
18. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in Sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:64-72.
19. Leuppi JD, Salome CM, Jenkins CR, Anderson SD, Xuan W, Marks GB et al. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:406-412.
20. Romagnoli M, Vachier I, Tarodo DIF, et al. Eosinophilic inflammation in sputum of poorly controlled asthmatics. *Eur Respir J* 2002;20:1370-1377.
21. Lemière C, Chaboillez S, Malo JL, Cartier A. Changes in sputum cell counts after exposure to occupational agents: what do they mean? *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107:1063-1068.

22. Alvarez MJ, Estrada JL, Gozalo F, et al. Oilseed rape flow: another allergen causing occupational sthma in farmers. *Allergy* 2001; 56:185-188.
23. Maestrelli P, Calcagni P, Saetta M, Di Stefano A, Hosselet JJ, Santonastaso A, Fabbri LM and Mapp CE. Sputum eosinophilia after asthmatic responses induced by isocyanates in sensitized subjects. *Clin Exp Allergy* 1994; 24:29-34.
24. Obata H, Dittrick M, Chan H, Chan-Yeung. Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with western red cedar asthma. *Eur Respir J* 1999; 13: 489-495.
25. Quirce S, Baeza ML, Tornero P, et al. Occupational asthma caused by exposure to cyanoacrilate. *Allergy* 2001; 56:446-449.
26. Lemière C. The use of sputum eosinophils in the evaluation of occupational asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:81-85.
27. Park H, Jung K, Kim H et al. Neutrophil activation following TDI bronchial challenger to the airway secretion from subjects with TFI.induced asthma. *Clin ExpAllergy* 1999; 29:1395-1401.
28. Lemière C, Romeo P, Chaboillez S, et al. Airway inflammation and functional changes after exposure to different concentrations of isocyanates. *J Allery CliN Immunol* 2002; 110:641-646.
29. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002; 57:643-648.
30. Liu J, S. Thomas P. Exhaled breath condensate as a method of sampling airway nitric oxide and other markers of inflammation. *Med Sci Monit* 2005; 11(8): MT53-62.
31. Silkoff PE, Lent AM, Busacker AA, Katial RK, Balzar S, Strand M, Wenzel SE. Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilic phenotype in severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:1249-55.
32. Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax* 2006; 61:817-827.

33. Kharitonov SA, O'Connor BJ, Ewans DJ, Barnes PJ. Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151 (6):1894-9.
34. Allmers H, Chen Z, Barbinova L, Marczynski B, Kirschmann V, Baur X. Challenge from methacoline, natural rubber latex, or 4,4-diphenylmethane diisocyanate in workers with suspected sensitization affects exhaled nitric oxide (change in exhaled NO levels after allergen challenges). *Int Arch Occup Environ health* 2000; 73(3):181-6.
35. Barbinova L, Baur X. Increase in exhaled nitric oxide (eNO) after Work-related isocyanate exposure. *Int Arch Occup Environ health* 2006; 79:387-395.
36. Piipari R, Piirila P, Keskinen H, Tuppurainen M, Sovijarvi A, Nordman H. Exhaled nitric oxide in specific challenge test to assess occupational asthma. *Eur Respir J* 2002; 20:1532-1537.
37. Van Miert E, Dumont X, Bernard A. CC16 as a marker of lung epithelial hyperpermeability in a acute model of rats exposed to mainstream cigarette smoke. *Toxicology letters* 2005; 159:115-123.
38. Hermans C, Petrek M, Kolek V, Weynand B, Pieters T, Lambert M, Bernard A. Serum Clara cell protein (CC16), a marker of the integrity of the air-blood barrier in sarcoidosis. *Eur Respir J* 2001; 18:507-514.
39. Shjiubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, Sugaya F, Hiarasawa M, Yamada T, Kawai T, Abe S. Serum levels of Clara cell 10-kDa protein are decreased in patients with asthma. *Lung* 1999; 177:45-52.
40. Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins. *Am J Crit Care Med* 1999; 159:646-678.
41. Broeckeaert F, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clinical and Experimental Allergy* 2000; 30:469-475.

42. Mansur AH, Fryer AA, Hepple M, Strange RC, Spiteri MA. An association study between the Clara cell secretory protein CC16A38G polymorphism and asthma phenotypes. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:994-999.
43. Robin M, Dong P, Hermans C, Bernard A, Bersten AD, Doyle IR. Serum levels of CC16, SP-A and SP-B reflect tobacco-smoke exposure in asymptomatic subjects. *Eur Respir J*, 2002; 20:1152-1161.
44. Timonen KL, Hoek G, Heinrich J, Bernard A, Brunekreef B, Hartog J, Hameri K, Ibald-Mulli A, Mirme A, Peters A, Tittanen P, Kreyling WG, Pekkanen J. Daily variation in fine and ultrafine particulate air pollution and urinary concentrations of lung Clara cell protein CC16. *Occup Environ Med* 2004; 61:908-914.
45. Helleday R, Segerstedt B, Forsberg B, Mudway I, Nordberg G, Bernard A, Blomberg A. Exploring the time dependence of serum Clara cell protein as a biomarker of pulmonary injury in humans. *Chest* 2006 130 (3):672-675.
46. Arsalane K, Broeckaert F, Knoop B, Clippe A, Buchet JP, Bernard A. Increased serum and urinary concentrations of lung Clara cell protein in rats acutely exposed to ozone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999; 159:169-174.
47. Michel O, Murdoch R, Bernard A. Inhaled LPS induces blood release of Clara cell specific protein (CC16) in human beings. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 115:1143-7.
48. Lagerkvist BJ, Bernard A, Blomberg A, Bergstrom E, Forsberg B, Holmstrom K, Karp K, Lundstrom NG, Segerstedt B, Svensson M, Nordberg G. Pulmonary epithelial integrity in children: relationship to ambient ozone exposure and swimming pool attendance. *Environmental Health perspectives* 2004; 112 (17):1768-1771.
49. Mapp CE, Boschetto P, Maestrelli P, Fabbri LM. Occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:280-305.

50. Bernstein L, Bernstein DI, Chan-Yeung M, Mal JL. Definition and Classification of Asthma in the workplace. In *Asthma in the Workplace*. New York Taylor & Francis, 2006; p.4.
51. Mapp CE. Agents, old and new, causing occupational asthma. *Occup Environ Med* 2001 May;58(5):354-60, 290
52. Musk AW, Peters JM, Wegman DH. Isocyanates and respiratory disease: current status. *Am J Ind Med* 1988; 13: 331-349.
53. Vainio H, Rosenberg C, Hirvonen A, Norppa H. International Workshop on Biomarkers for isocyanates. *Scan J Work Environ Health* 1999; 25 (2): 157-159.
54. Levine SP, Hillig KJD, Dharmarajan V, Spence MW, Baker MD. Critical review of methods of sampling, analysis, and monitoring for TDI and MDI. *Am Ind Hyg Assoc J* 1995; 56: 581-589.
55. Sari-Minodier I, Charpin D, Signouret M, Poyen D, Vervloet D. Prevalence of self-reported respiratory symptoms in workers exposed to isocyanates. *J Occup Environ Med* 1999; 41 (7): 582-588.
56. Lombardo LJ, Balmes JR. Occupational asthma: a review. *Environmental Health Perspectives Supplements*, August 2000; 108 (suppl 4):697-704.
57. Malo JL, Chan-Yeung M. Occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 (3):317-327.
58. ATS/ERS Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:912-930.
59. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, Van Der Grinten CPM, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, Macintyre, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319-338

60. Communauté Européenne du Charbon e de l'Acier. Aide-memoir of Spirographic practice for examining ventilatory function.. Industrial Health and Medicine. 2<sup>nd</sup> ed. Luxemburg, 1971.
61. Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, Johnson DC, Van Der Grinten CPM, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Enright P, Gustfsson P, HanKinson J, Jensen R, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Wanger J. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 26: 720-735.
62. Cartier A. Definition and diagnosis of occupational asthma. *Eur Respir J* 1994;7:153-160.
63. Sheffer AL. International consensus report on diagnosis and treatment of asthma. *Eur Respir J* 1992;5:601-641.
64. Meyer JD, Holt DL, Chen Y, Cherry NM, Mc Donald JC. SWORD '99: surveillance work-related and occupational respiratory disease in the UK. *Occup Med (London)* 2001;51:204-208.
65. Maestrelli P, Ferrazzoni S, Visentin A, Marian E, Dal Borgo D, Accordino R, Fabbri LM. Measurement of exhaled nitric oxide in healthy adults. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2007; 24:65-69.
66. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Sperandio S, Boner AL. Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J*. 1999 Jun;13(6):1386-90.
67. Park H, Jung K, Kim H et al. Neutrophil activation following TDI bronchial challenger to the airway secretion from subjects with TFI induced asthma. *Clin ExpAllergy* 1999; 29:1395-1401.
68. Andersson L, Lundberg P-A, Barregard L. Methodological aspects on measurement of Clara cell protein in urine as a biomarker for airway toxicity, compared with serum levels. *J Appl. Toxicol.* 2007; 27: 60-66.
69. Baur X, Marek W, Ammon J, et al. Respiratory and other hazards of isocyanates. In *Arch Occup Environ Health* 1994; 66:141-152.

70. Van Vyve T, Chanez P, Bernard A. Protein content in BAL fluid of patients with asthma and control subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 1995; 95:60-68.
71. Lensmar C, Nord M, Gudmundsson GH, Roquet A, Andersson O, Jornvall H, Eklund A, Grunewald J, Agerberth B. Decreased pulmonary levels of the anti-inflammatory Clara cell 16 kda protein after induction of airway inflammation in asthmatics. *CMLS, Cell Mol Life Sci*, 2000; 57:976-981.
72. Gioldassi XM, Papidimitriou H, Mikraki V, Karamanos NK. Clara cell secretory protein: determination of serum levels by an enzyme immunoassay and its importance as an indicator of bronchial asthma in children. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004; 34:823-826.
73. Martin AC, Lang IA, Khoo SK, Zhang G, Rueter K, Teoh L, Taheri S, Hayden CM, Geelhoed GC, Goldblatt J, Le Souef PN. Acute asthma in children: relationships among CD14 and CC16 genotypes, plasma levels and severity. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006;173: 617-622.
74. Blomberg A, Mudway I, Svensson M, Hagenbjork-gustafsson A, Thomasson L, Helleday R, Dumont X, Forsberg B, Nordberg G, Bernard A. Clara cell protein as a biomarker for ozone-induced lung injury in Humans. *Eur Respir J*, 2003; 22:883-888.
75. Arsalane K, Broeckaert F, Knoops B, Wiedig M, Tobeau G, Bernard A. Clara cell specific protein (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intratracheal lipopolysaccharide administration. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161: 1624-1630.

**TABELLE**

**E**

**FIGURE**