



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Centro di Eccellenza per lo studio dei meccanismi molecolari di comunicazione tra cellule: dalla ricerca di base alla clinica

**CORSO DOTTORATO DI RICERCA IN IMMUNOLOGIA CLINICA E
SPERIMENTALE XXXII ciclo**

***ASPETTI IMMUNOLOGICI DELLA BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA
OSTRUTTIVA E CORRELAZIONI CON IL FENOTIPO CLINICO DI
MALATTIA***

Dottorando: Cassia Sebastiano

Tutor: Prof. Fulvio Braido

INDICE

| | |
|--|----|
| LA BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA | 4 |
| Definizione | 4 |
| Fattori di rischio | 4 |
| Sintomatologia | 5 |
| Diagnosi | 6 |
| Classificazione della gravità dell'ostruzione delle vie aeree..... | 8 |
| ASPETTI IMMUNOLOGICI DELLA BPCO | 9 |
| Immunità Innata: Caratteristiche generali | 9 |
| Riconoscimento dei microbi e del self danneggiato..... | 10 |
| Risposta antivirale | 13 |
| Cellule dell'immunità innata nella BPCO..... | 16 |
| Epitelio delle vie aeree | 16 |
| Macrofagi alveolari | 17 |
| Cellule dendritiche | 17 |
| Neutrofilii | 18 |
| Cellule Natural Killer | 19 |
| Funzioni effettrici delle cellule NK..... | 19 |
| Recettori attivatori e inibitori delle cellule NK..... | 21 |
| Cellule NK nella BPCO | 25 |
| IMMUNITA' ADATTATIVA NELLA BPCO | 26 |
| Linfociti T | 26 |
| Linfociti B | 27 |
| SCOPO DEL LAVORO | 28 |
| MATERIALE E METODI | 29 |
| Popolazione dello studio | 29 |
| Criteri di inclusione ed esclusione..... | 29 |
| Esami a cui sono stati sottoposti i soggetti dello studio | 29 |
| Tomografia computerizzata del torace | 30 |
| Intervento chirurgico | 30 |
| Inclusione in paraffina..... | 31 |
| Colorazione immunoistochimica (IHC)..... | 31 |

| | |
|---|----|
| Sparaffinatura dei campioni | 31 |
| Reidratazione..... | 31 |
| Smascheramento antigenico | 31 |
| Colorazione per IRF3 e MDA5 | 31 |
| Colorazione per NKp46 ⁺ | 32 |
| Montaggio del preparato | 33 |
| Disidratazione e diafanizzazione..... | 33 |
| Montaggio in balsamo | 33 |
| Analisi microscopica | 33 |
| Sezioni colorate per IRF3 e MDA5..... | 33 |
| Sezioni colorate per Nkp46 | 33 |
| RISULTATI | 35 |
| Espressione di cellule NKp46 ⁺ | 36 |
| Espressione del fattore di trascrizione IRF-3 | 37 |
| Espressione del recettore citosolico MDA5 | 39 |
| Confronto dei risultati ottenuti | 41 |
| DISCUSSIONE | 42 |
| CONCLUSIONI | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | 47 |

LA BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA

Definizione

La Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) è una sindrome respiratoria complessa, sia prevenibile che trattabile, caratterizzata da sintomi respiratori persistenti e ostruzione del flusso aereo irreversibile. Ad oggi la BPCO è tra le patologie più diffuse, costituendo la quarta causa di morte nei paesi industrializzati [1], e si stima possa diventare la terza entro il 2030, preceduta solo da tumori e patologie cardiovascolari [2,3]. Rappresenta un importante problema per sanità pubblica; molte persone soffrono di questa malattia per anni e muoiono prematuramente a causa delle sue complicanze. I sintomi respiratori più comuni comprendono dispnea, tosse e produzione di espettorato, alle volte sottostimati dal paziente [4]. Il persistere della sintomatologia è riconducibile alla flogosi cronica delle vie aeree, che determina il danno tissutale tipico dell'enfisema e bronchite cronica. L'alterato rapporto ventilazione/perfusione e la riduzione del flusso aereo generano un quadro di ipossiemia e ipercapnia che tendono a peggiorare progressivamente, con possibile sviluppo di ipertensione polmonare dovuta alla riduzione del letto vascolare, tipica del polmone enfisematoso, alla vasocostrizione ipossica e, nei fumatori, all'effetto diretto del fumo di sigaretta a livello delle arterie con caratteristico rimodellamento delle stesse. Il quadro di ipertensione polmonare determina successivamente uno scompenso cardiaco sinistro che peggiora ulteriormente le condizioni del paziente. La BPCO può manifestare eventi acuti, con peggioramento delle funzioni polmonari e sintomi che richiedono l'uso di antibiotici e/o corticosteroidi sistemici, noti come riacutizzazioni.

Fattori di rischio

In tutto il mondo, il fattore di rischio più comune per la BPCO è il fumo di tabacco, ma anche i non fumatori possono sviluppare la malattia. La BPCO, infatti, è il risultato di una complessa interazione di esposizione cumulativa a lungo termine a gas nocivi e particelle, combinata con una varietà di fattori dell'ospite tra cui il profilo genetico, l'iperreattività delle vie aeree ed il minor sviluppo del polmone durante l'infanzia [5-7]. Il rischio di sviluppare la BPCO è correlato ai seguenti fattori:

- *Il fumo di tabacco.* I fumatori di sigarette presentano una prevalenza più elevata di sintomi respiratori e di anomalie della funzione polmonare, un più alto tasso annuo di

declino del FEV1(o VEMS, importante parametro della funzione respiratoria, ossia il massimo volume che può essere espirato durante il primo secondo, indicante il grado di pervietà delle vie aeree) e un più alto tasso di mortalità per BPCO rispetto ai non fumatori [8]. Anche altri tipi di fumo di tabacco, diversi dalla sigaretta (come pipa, sigaro, pipa ad acqua) [9-11], e la marijuana [12] sono fattori di rischio per la BPCO, così come il fumo di tabacco passivo (ETS: Environmental Tobacco Smoke o second-hand smoke) [13].

- *L'inquinamento degli ambienti interni ("indoor")*, derivante dalla combustione del legno o di altri combustibili da biomassa utilizzati per cucinare e per il riscaldamento in ambienti scarsamente ventilati, è un fattore di rischio che colpisce in particolare le donne nei Paesi in via di sviluppo [14,15].
- *L'esposizione professionale*, tra cui le polveri organiche ed inorganiche, agenti chimici e gas di scarico, sono fattori di rischio sottostimati per la BPCO [14,16].
- *L'inquinamento dell'aria esterna ("outdoor")*, a cui contribuisce anche il carico globale polmonare di particelle inalate, anche se sembra avere un effetto relativamente piccolo nel causare la BPCO.
- *Fattori genetici*, come il deficit ereditario grave di alfa-1 antitripsina (AATD) [17]; anche i geni che codificano per la metallo proteinasi di matrice 12 (MMP-12) e per la glutatione S-transferasi sono stati associati a declino della funzione polmonare [18] o rischio di BPCO [19].
- *Età e sesso*. L'invecchiamento e il genere femminile aumentano il rischio di BPCO.
- *La crescita e lo sviluppo del polmone*. Qualsiasi fattore che influenza la crescita polmonare durante la gestazione e l'infanzia (basso peso alla nascita, infezioni respiratorie, ecc.) ha il potenziale di aumentare il rischio di un individuo di sviluppare la BPCO.

Sintomatologia

Essendo nella maggior parte dei casi pazienti anziani e fumatori si ha spesso un ritardo nella diagnosi, anche perché questi soggetti tendono a giustificare i sintomi come normali, riconducibili all'età avanzata o allo stato di fumatori, sottovalutandoli. La dispnea cronica e progressiva è sicuramente il sintomo principale della BPCO. In questi soggetti molto comunemente troviamo anche un quadro di tosse, che può essere produttiva o non produttiva [20], sempre più presente nella vita dei pazienti fino ad occupare buona parte della giornata.

Respiro sibilante e costrizione toracica sono dei sintomi molto eterogenei che possono variare nel corso della giornata L'assenza di questi due sintomi non esclude la diagnosi di BPCO.

Astenia, calo ponderale e anoressia sono invece tipici delle forme di BPCO grave e molto grave [21-22], importanti anche da un punto di vista prognostico [23-24] e come campanelli di allarme per il possibile sviluppo di altre patologie (come tubercolosi, cancro al polmone).

Diagnosi

La diagnosi clinica di BPCO dovrebbe essere presa in considerazione in tutti i pazienti che presentano dispnea, tosse cronica o espettorazione e/o una storia di esposizione ai fattori di rischio per la malattia (Tabella 1). La spirometria è necessaria per fare la diagnosi clinica in questo contesto clinico [25]; la presenza di un rapporto VEMS/CVF <0.70 post-broncodilatazione conferma la presenza di ostruzione bronchiale persistente e quindi della BPCO nei pazienti con sintomi appropriati e significative esposizioni a stimoli nocivi. La spirometria è la misura di limitazione del flusso aereo più riproducibile e oggettiva. Si tratta di un test non invasivo e facilmente disponibile. Nonostante la sua buona sensibilità, la misura di picco di flusso espiratorio da solo non può essere utilizzata in modo affidabile come unico test diagnostico per la sua bassa specificità [26].

| | |
|--|--|
| Dispnea: | Progressiva nel tempo Peggiora solitamente con lo sforzo Persistente |
| Tosse cronica: | Può essere intermittente e può essere non produttiva Respiro sibilante ricorrente |
| Produzione cronica di espettorato: | Qualsiasi tipo di espettorazione cronica può indicare la presenza di BPCO |
| Infezioni ricorrenti delle vie aeree inferiori | |
| Storia di esposizione ai fattori di rischio: | Fattori legati all'ospite (come i fattori genetici, anomalie congenite, anomalie dello sviluppo, ecc.) Fumo di tabacco (incluse le preparazioni locali generiche) Fumo proveniente da biocombustibili per cucinare e riscaldare Polveri, vapori, fumi, gas e altri agenti chimici professionali |
| Familiarità per BPCO e/o fattori legati all'infanzia: | Ad esempio basso peso alla nascita, infezioni respiratorie nell'infanzia |

Tabella 1. (Indicatori chiave per la diagnosi di BPCO – Linee guida GOLD) È necessario considerare la diagnosi di BPCO ed eseguire la spirometria se uno dei seguenti indicatori è presente in un individuo di età superiore a 40 anni. Questi indicatori non sono diagnostici di per sé, ma la presenza di più indicatori chiave aumenta la probabilità di una diagnosi di BPCO. La spirometria è necessaria per confermare la diagnosi di BPCO.

Diagnosi differenziale: La principale diagnosi differenziale è con l'asma. In alcuni pazienti con asma cronico, una chiara distinzione dalla BPCO non è possibile utilizzando le tecniche di imaging e i test funzionali attualmente disponibili. In questi pazienti, il trattamento è simile a quello dell'asma (Tabella 2).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità raccomanda che tutti i pazienti con una diagnosi di BPCO debbano essere sottoposti a screening del deficit di alfa-1 antitripsina (AATD) almeno una volta nella vita, soprattutto nelle zone con elevata prevalenza di AATD [27]. Una bassa concentrazione (<20% del normale) è altamente suggestiva di deficit omozigote. Tutti i membri della famiglia di un paziente affetto da tale deficit dovrebbero essere sottoposti a screening.

| Diagnosi | Caratteristiche distintive |
|--------------------------------------|---|
| BPCO | Esordio in soggetti di mezza età Sintomi lentamente progressivi Storia di fumo di tabacco oppure esposizione ad altri tipi di fumo |
| Asma bronchiale | Esordio precoce (spesso nell'infanzia) Sintomatologia variabile a seconda dei giorni Frequenti sintomi notturni o nelle prime ore del mattino Spesso presenti allergia, rinite e/o eczema Storia familiare di asma Coesistenza di obesità |
| Scompenso Cardiac Congestizio | La radiografia del torace mostra aumento dell'ombra cardiaca, edema polmonare Le prove di funzionalità respiratoria mostrano una sindrome restrittiva e non ostruttiva |
| Bronchiectasie | Espettorato abbondante e purulento Comunemente associate a infezioni batteriche Radiografia/TC del torace mostrano dilatazioni bronchiali, ispessimento delle pareti bronchiali |
| Tubercolosi | Esordio in qualunque età La radiografia del torace mostra un infiltrato polmonare Esami microbiologici di conferma Elevata prevalenza locale di tubercolosi |
| Bronchiolite Obliterante | Esordio in età giovanile, in soggetti non fumatori Può essere presente una storia di artrite reumatoide o esposizione acuta a fumi Osservata dopo trapianto polmonare o di midollo osseo |
| Panbronchiolite Diffusa | Prevalentemente osservata in pazienti di origine asiatica La maggior parte dei pazienti sono maschi e non fumatori Quasi tutti i pazienti mostrano sinusite cronica La radiografia al torace e la HRCT mostrano opacità diffuse nodulari centrolobulari di piccole dimensioni e iperinflazione |

Tabella 2. Questi fattori tendono a essere caratteristici delle varie patologie, ma non sono presenti in ogni caso. Per esempio, una persona che non ha mai fumato può sviluppare BPCO (specialmente nei Paesi sottosviluppati, dove altri fattori di rischio sono più importanti dell'abitudine tabagica); l'asma può svilupparsi in pazienti adulti e anche nei pazienti anziani.

Classificazione della gravità dell'ostruzione delle vie aeree

La classificazione di gravità della ostruzione del flusso aereo nella BPCO (Tabella 3) utilizza specifici cut-point spirometrici per scopi di semplicità. La spirometria dovrebbe essere eseguita dopo la somministrazione di una dose adeguata di almeno un broncodilatatore inalatorio a breve durata d'azione per minimizzare la variabilità. Va notato che vi è solo una debole correlazione tra VEMS, sintomi e impatto sullo stato di salute di un paziente [28,29]. Per questo motivo, è necessaria anche un'accurata valutazione sintomatica.

| Nel pazienti con VEMS/ CVF <0.70: | | |
|-----------------------------------|-------------|-----------------------------------|
| GOLD 1: | Lieve | VEMS \geq 80% del predetto |
| GOLD 2: | Moderato | 50% \leq VEMS <80% del predetto |
| GOLD 3: | Grave | 30% \leq VEMS <50% del predetto |
| GOLD 4: | Molto grave | VEMS <30% del predetto |

Tabella 3. Classificazione di gravità della limitazione al flusso aereo nella bpcO (basata sul vems) post-broncodilatatore (*Linee guida GOLD*)

ASPETTI IMMUNOLOGICI DELLA BPCO

Le difese immunitarie innate nel polmone comprendono elementi strutturali, come la barriera epiteliale, la clearance mucociliare, peptidi antimicrobici, componenti del complemento e tensioattivi, ed elementi cellulari, come macrofagi, cellule dendritiche (DC), neutrofili, monociti, mastociti e cellule Natural killer, che proteggono l'ospite dalle infezioni. Tuttavia, nei pazienti con BPCO, l'infiammazione polmonare cronica e una risposta immunitaria alterata facilitano le infezioni respiratorie, aggravando il microambiente polmonare e la gravità della malattia. Sebbene in passato le infezioni batteriche siano state considerate la principale causa infettiva di esacerbazioni, recenti studi suggeriscono che i virus respiratori comuni (in particolare il rinovirus) sono responsabili di un'alta percentuale di esacerbazioni. Inoltre, le infezioni virali acute, che sono state persino testate sperimentalmente nell'uomo [30], sono considerate eventi chiave nella progressione della BPCO, aumentando l'infiammazione cronica sottostante [31], aumentando la carica virale [32], attivando infezioni latenti [31], o compromettendo la risposta immunitaria innata [33].

Immunità Innata: Caratteristiche generali

Il sistema immunitario innato consiste di svariati tipi cellulari e molecole solubili presenti nei tessuti e nel sangue, che prevengono l'invasione e l'instaurazione di infezioni da parte dei microbi. La risposta immunitaria innata offre una barriera difensiva precoce, prima che si possano sviluppare risposte adattative. L'immunità innata assolve a tre funzioni essenziali che ci proteggono dai microbi e dalle lesioni tissutali.

- È la risposta iniziale nei confronti di organismi patogeni e previene, controlla o elimina le infezioni. L'importanza dell'immunità innata nella difesa dell'ospite si evince dalle osservazioni cliniche e dagli studi sperimentali, dai quali emerge che i deficit, l'inibizione o l'eliminazione di uno dei numerosi meccanismi dell'immunità innata determina un sensibile incremento della suscettibilità alle infezioni. Le risposte immunitarie innate nei confronti di microrganismi patogeni possono tenere sotto controllo l'infezione fino all'attivazione di risposte immunitarie adattative spesso più potenti e specializzate, che sono in grado di eliminare i microbi che resistono alle difese dell'immunità innata.
- Elimina le cellule danneggiate e avvia il processo di riparazione tissutale. Tali meccanismi riconoscono e rispondono alle molecole che sono prodotte, rilasciate o

accumulate in cellule alterate, danneggiate o uccise. L'evento che scatena queste risposte può derivare da un danno cellulare e tissutale causato sia da processi infettivi sia non infettivi.

- L'immunità innata stimola e influenza la natura delle risposte adattative al fine di ottimizzarne l'efficacia contro diversi tipi di microbi. Inoltre, diversi componenti della risposta immunitaria innata possono reagire in modi diversi a microbi diversi, influenzando il tipo di risposta adattativa che si sviluppa.

I due principali tipi di risposta dell'immunità innata responsabili della protezione nei confronti dei microbi sono l'infiammazione e la difesa antivirale. L'infiammazione è il processo attraverso il quale i leucociti in circolo e le proteine plasmatiche si accumulano nei siti di infezione tissutale dove vengono attivati per uccidere ed eliminare i patogeni. La risposta infiammatoria costituisce anche la principale reazione che si instaura in presenza di cellule danneggiate o morte e nei casi di accumulo di sostanze anomale nelle cellule e nei tessuti. La difesa antivirale consiste nei cambiamenti cellulari atti a prevenire la replicazione virale e ad aumentare la suscettibilità delle cellule infettate all'uccisione da parte dei linfociti, eliminando in tal modo i siti di replicazione virale.

Riconoscimento dei microbi e del self danneggiato

I sistemi dell'immunità innata per il riconoscimento dei patogeni differiscono sostanzialmente da quelli dell'immunità adattativa per diversi aspetti. L'immunità innata riconosce strutture molecolari che sono prodotte dai patogeni. Tali strutture sono spesso condivise da diverse classi di microbi e sono chiamate profili molecolari associati ai patogeni (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP). Classi diverse di microbi, quali per esempio virus, batteri Gram-negativi, batteri Gram-positivi e funghi, esprimono PAMP differenti. Esempi di PAMP sono gli acidi nucleici caratteristici dei microrganismi quali l'RNA a doppia catena, di origine virale, e il DNA ricco di sequenze CpG non metilate, che si riscontra nei batteri; proteine microbiche che per esempio iniziano con una N-formil-metionina, tipica dei batteri; lipidi e carboidrati complessi sintetizzati dai microrganismi, ma non da cellule di mammifero, come i lipopolisaccaridi (LPS) nei batteri Gram-negativi, gli acidi lipoteicoici nei batteri Gram-positivi e gli oligosaccaridi con residui terminali di mannosio, che caratterizzano le glicoproteine microbiche.

L'immunità innata riconosce prodotti microbici che sono spesso indispensabili per la sopravvivenza dei microrganismi. Ciò è importante perché garantisce che tali molecole, bersaglio dell'immunità innata, non possano essere modificate da microbi nel tentativo di

sfuggire al riconoscimento dell'ospite. Per esempio, l'RNA virale a doppia elica è un intermediario essenziale nel ciclo replicativo di numerosi virus, mentre l'LPS e l'acido lipoproteico sono componenti strutturali delle pareti batteriche e sono dunque necessari per la loro sopravvivenza.

L'immunità innata è anche in grado di riconoscere molecole endogene prodotte o rilasciate dalle cellule danneggiate o morte. Queste sostanze sono chiamate profili molecolari associati al danno (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP). I DAMP possono essere il risultato di un danno cellulare di origine infettiva o non infettiva, per esempio di natura ambientale o ischemico. Le cellule apoptotiche, generalmente, non rilasciano DAMP. In alcuni casi, le cellule sane del sistema immunitario vengono stimolate a produrre certi DAMP, definiti allarmine, con lo scopo di potenziare la risposta innata alle infezioni.

L'immunità innata riconosce i PAMP e i DAMP utilizzando sia i recettori cellulari, distribuiti in diversi compartimenti cellulari, sia molecole solubili presenti nel sangue e nelle secrezioni mucose. I recettori cellulari sono espressi da fagociti (principalmente poste all'interfaccia tra organismo e ambiente) e molti altri tipi cellulari e sono noti come recettori che riconoscono cellulari e sono noti come recettori che riconoscono i profili molecolari (Pattern Recognition Receptors, PRR): essi sono espressi sulla membrana plasmatica, nelle vescicole fagocitiche e nel citosol. Quando i PRR cellulari legano i PAMP o i DAMP attivano vie di trasduzione del segnale che promuovono le funzioni antimicrobiche e proinfiammatorie della cellula. Quasi tutte le cellule esprimono PRR e possono dunque partecipare alla risposta immunitaria innata. Tuttavia le cellule che presentano maggiori varietà e quantità di PRR sono i fagociti (neutrofili e macrofagi) e le cellule dendritiche, coerentemente alla loro funzione. I PRR possono essere suddivisi per classi strutturali e funzionali:

Recettori Toll-like. Rappresentano un'importante famiglia di PRR espressi da molti tipi cellulari. Essi sono responsabili della risposta ad un'ampia varietà di molecole espresse dalle cellule microbiche ma non dalle cellule normali. I ligandi riconosciuti dai differenti TLR sono strutturalmente diversi e includono prodotti di tutte le classi di microrganismi. Sono anche coinvolti nella risposta a molecole endogene, la cui espressione o localizzazione indica la presenza di un danno cellulare. Quando i TLR riconoscono i propri ligandi innescano diverse cascate di trasduzione del segnale che portano all'attivazione di fattori di trascrizione, i quali inducono l'espressione di geni fondamentali per le risposte infiammatoria e antivirale. I principali fattori di trascrizione attivati dai TLR sono il fattore nucleare κB (Nuclear

Factor κ B, NF- κ B), la proteina di attivazione 1 (Activation Protein 1, AP-1), il fattore di risposta dell'interferone 3 (Interferon Response Factor 3, IRF3) e IRF7. Nf- κ b e AP-1 sono responsabili della produzione della maggior parte delle molecole necessarie per la risposta infiammatoria, tra cui le citochine proinfiammatorie (come TNF e IL-1), chemochine (come CCL2 e CXCL8) e molecole di adesione endoteliali (per esempio E-selectina). IRF3 e IRF7 promuovono invece la produzione di interferoni di tipo I (IFN- α e INF- β), importanti per le risposte antivirali.

Recettori citosolici per i PAMP e i DAMP. Oltre ai TLR, che riconoscono i patogeni all'esterno della cellula o negli endosomi, le cellule dell'immunità innata esprimono i PRR e i loro ligandi a livello citosolico. Tre importanti classi di questi recettori sono:

- *Recettori di tipo NOD* (Nucleotide Oligomerization Domain-Containing Protein). Costituiscono una famiglia che comprende più di 20 proteine citosoliche, alcune delle quali riconoscono i PAMP e i DAMP citoplasmatici e assemblano complessi di trasduzione del segnale che promuovono l'infiammazione. La sottofamiglia di recettori di tipo NOD denominata NLRP risponde ai PAMP e ai DAMP citosolici formando complessi attivatori detti inflammasomi, che generano forme attive delle citochine infiammatorie IL-1 e IL-18. L'inflammasoma di NLRP può essere attivato da una grande varietà di stimoli citoplasmatici associati a infezioni o stress cellulare tra cui i prodotti dei microbi, cristalli ambientali o endogeni e riduzione della concentrazione citosolica di ioni potassio.
- *Recettori di tipo RIG (RIG-like Receptors)*. Sono sensori citosolici dell'RNA virale cui rispondono attivando la produzione di IFN di tipo I con funzione antivirale. Gli RLR riconoscono RNA a doppia elica ed eteroduplex di RNA-DNA, che includono il genoma di virus a RNA e i trascritti di RNA di di virus a RNA e a DNA. I due RLR meglio caratterizzati sono RIG-1 (retinoic Acid-Inducible Gene 1) e MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Gene 5). Entrambi contengono due domini N-terminali responsabili del reclutamento delle caspasi, e altri due domini, una RNA elicasi e uno C-terminale, coinvolti nel riconoscimento dell'RNA. RIG-I e MDA5 riconoscono diversi tipi di RNA che sono caratteristici di virus diversi, sulla base della loro lunghezza. Dopo aver legato l'RNA virale, gli RLR iniziano eventi di trasduzione del segnale che danno luogo a fosforilazione e attivazione di IRF3, IRF7 e NK- κ B, i quali inducono la produzione di interferoni di tipo I.

- *Sensori di DNA citosolico (CDS)*. Sono molecole che rilevano la presenza di DNA nel citosol e attivano vie di trasduzione che avviano le risposte antimicrobiche, fra cui produzione di interferone di tipo 1 e autofagia. Il DNA può essere rilasciato nel citosol da vari microbi intracellulari in funzione di vari meccanismi.

Recettori per i carboidrati. Riconoscono i carboidrati presenti sulla superficie dei microbi, facilitando la fagocitosi e la secrezione delle citochine che promuovono le successive risposte dell'immunità adattativa (ad esempio recettori del mannosio, detectine).

Recettori scavenger. Comprendono un insieme di proteine di membrana che si distinguono dal punto di vista strutturale e funzionale. Alcuni dei recettori scavenger, come per esempio SR-A e CD36, sono espressi dai macrofagi e sono coinvolti nella fagocitosi dei microrganismi.

Recettori per i peptidi formilati (FPR). L'FPR1 è espresso dai leucociti, riconosce peptidi batterici contenenti residui di N-formilmetioninici e stimola il movimento direzionale delle cellule. Questi recettori iniziano la trasduzione del segnale intracellulare attraverso le proteine G eterotrimeriche a essi associate.

Risposta antivirale

L'immunità innata reagisce alle infezioni virali prevalentemente tramite la produzione di IFN di tipo I, la cui azione principale è l'inibizione della replicazione virale. Gli IFN di tipo I vengono secreti dalle cellule che esprimono PRR, come TLR, NLR, RLR e STING, e agiscono su altre cellule per prevenire la diffusione dell'infezione. Con il termine "INF di tipo I" si intende una grande famiglia di citochine correlate dal punto di vista strutturale e funzionale, che mediano la risposta immunitaria innata alle infezioni virali. Il termine "interferone" deriva dalla capacità di queste citochine di interferire con lo sviluppo dell'infezione virale. Esistono diversi tipi di IFN di tipo I, che sono strutturalmente omologhi e codificati da un cluster di geni presenti sul cromosoma 9. I più importanti per le difese antivirali sono gli IFN- α (che in effetti sono un gruppo di 13 diverse proteine strettamente correlate) e l'INF- β , che è invece un'unica proteina. Le cellule dendritiche plasmacitoidi sono la principale fonte di IFN- α , che viene però prodotto anche dai fagociti mononucleati. L'INF- β è invece prodotto da svariati tipi cellulari. Gli acidi nucleici virali sono lo stimolo più potente in grado di indurre la sintesi di IFN di tipo I. Come già descritto, i

recettori citosolici di tipo RIG, i sensori di DNA e i TLR a localizzazione endosomiale (TLR 3, 7, 8 e 9) riconoscono gli acidi nucleici virali e attivano i fattori di trascrizione della famiglia IRF, i quali sono responsabili dell'espressione dei geni che codificano per gli IFN di tipo I (Figura 1).

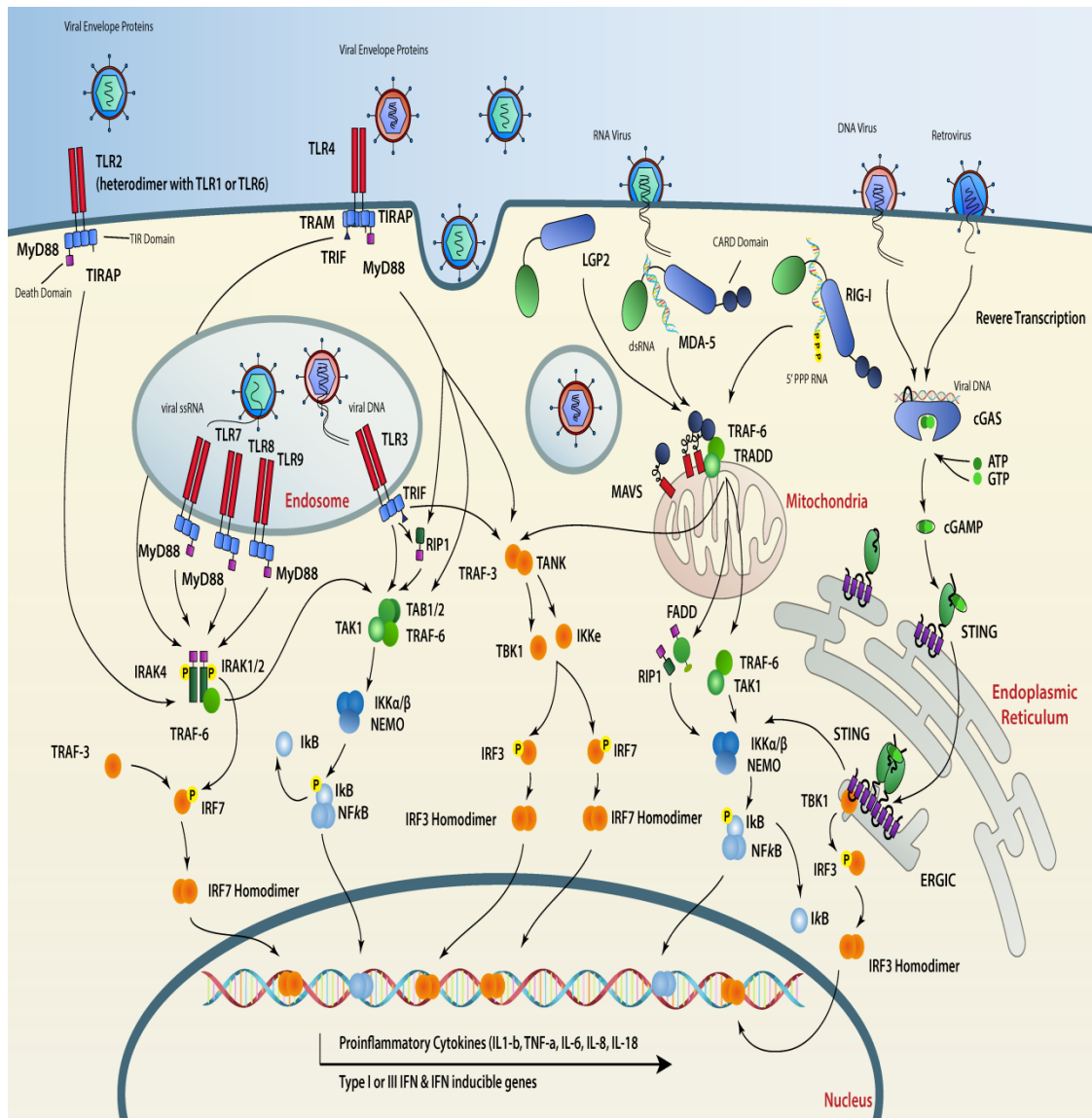


Fig.1 Sistema di rivelazione virale nell'immunità innata e trasduzione del segnale (*The Innate Antiviral Response in Animals: An Evolutionary Perspective from Flagellates to Humans*)

Sia l'IFN- α che l'IFN- β legano un unico recettore eterodimerico denominato *recettore per gli IFN di tipo I*, composto da due catene polipeptidiche strutturalmente correlate (denominate IFNAR1 e IFNAR2) ed espresso in maniera ubiquitaria. Questo recettore attiva i fattori trascrizionali che determinano la trascrizione di geni coinvolti in diversi meccanismi antivirali:

- Conferimento del cosiddetto “stato antivirale” alle cellule bersaglio, ovvero di resistenza alle infezioni virali. Tra i geni indotti dagli IFN di tipo I vi sono la PKR, una serinatreonina chinasi attivati dall’RNA a doppia catena che blocca la trascrizione e trasduzione virale, la 2’,5’oligoadenilato sintetasi e le RNasi L, che favoriscono la degradazione dell’RNA virale. L’azione antivirale degli IFN di tipo I si esplica principalmente un meccanismo paracrino in cui la cellula infettata secerne IFN che agiscono sulle cellule limitrofe non ancora infettate, rendendole resistenti. Gli effetti degli IFN di tipo I non sono specifici per i virus e parte della capacità di queste citochine di bloccare la diffusione dell’infezione è ascrivibile alla loro tossicità per le cellule dell’ospite poste nelle vicinanze delle cellule infette. L’IFN secreto da una cellula può anche agire in modo autocrino, inibendo la replicazione virale nella cellula che l’ha prodotto.
- Segregazione dei linfociti nei linfonodi, per massimizzare l’opportunità di incontro con l’antigene. Ciò avviene grazie all’espressione di una proteina, chiamata CD69, che forma un complesso con il recettore per la sfingosina 1-fosfato (S1PRI1) riducendone l’espressione. La fuoriuscita dei linfociti dai tessuti linfoidi dipende, infatti, dai legami della sfingosina 1-fosfato con l’S1PRI1; ne consegue che la sua ridotta espressione trattiene i linfociti negli organi linfoidi.
- Aumento della citotossicità delle cellule NK e dei linfociti CD8⁺ citotossici e differenziamento dei linfociti T *naive* in cellule effettrici Th1. Ciò stimola sia l’immunità innata che quella adattativa contro le infezioni intracellulari virali e batteriche.
- Aumento dell’espressione di molecole MHC di classe I per aumentare la probabilità che le cellule infettate siano riconosciute e uccise dai linfociti T CD8⁺ citotossici. Questi linfociti riconoscono sulla superficie delle cellule infettate peptidi virali presentati da molecole MHC di classe I. Aumentando l’espressione di molecole MHC di classe I, gli IFN di tipo I aumentano indirettamente anche il numero di complessi “peptide virale-MHC di classe I” che possono essere riconosciuti dai linfociti CD8⁺ e ciò facilita l’uccisione della cellula sede della replicazione virale e l’eradicazione dell’infezione stessa.

In conclusione, gli IFN di tipo I esplicano diverse funzioni che lavorano in concerto per contrastare le infezioni virali. I topi knock-out per il recettore di questi IFN sono più sensibili alle infezioni virali [34].

La protezione contro i virus si esercita anche mediante l'attivazione di meccanismi apoptotici intrinseci e l'aumento della sensibilità a stimoli apoptotici estrinseci nelle cellule infettate. Le proteine virali sintetizzate nelle cellule infettate possono avere una conformazione terziaria non corretta e il loro accumulo può culminare nell'apoptosi della cellula. Inoltre, le cellule infettate da virus sono particolarmente sensibili all'apoptosi causata da TNF. Infine, le cellule infettate diventano più sensibili agli effetti proapoptotici del TNF, abbondantemente rilasciato insieme agli IFN di tipo I dalle cellule dendritiche plasmacitoidi e dai macrofagi attivati. Il recettore di tipo I per il TNF attiva sia vie proinfiammatorie che proapoptotiche. Quale delle due predomini nelle singole situazioni dipende dallo stato della sintesi proteica nella cellula bersaglio: le infezioni virali possono spostare l'equilibrio verso l'apoptosi.

Cellule dell'immunità innata nella BPCO

Il sistema immunitario innato polmonare è composto da 5 componenti principali: la barriera epiteliale delle vie aeree, i macrofagi alveolari, le cellule dendritiche, i neutrofili e le cellule Natural Killer.

Epitelio delle vie aeree

L'epitelio delle vie aeree è costituito da uno strato pseudo stratificato di cellule epiteliali che rivestono l'albero tracheobronchiale. È la prima popolazione cellulare ad interagire con i contaminanti ambientali inalati, i patogeni respiratori e varie sostanze tossiche presenti nell'aria. Normalmente questo epitelio, essendo composto da cellule ciliate che secernono muco, svolge un ruolo importante nella rimozione di microbi e particelle estranee attraverso la clearance mucociliare. È costituito inoltre da cellule secretorie non mucose producono proteine antimicrobiche e antinfiammatorie, e da cellule basali che funzionano come cellule staminali per rinnovare la popolazione differenziata. Oltre al ruolo antimicrobico, proinfiammatorio e immunoregulatorio, l'epitelio costituisce una barriera fisica contro ambiente esterno, essendo dotato di giunzioni strette tra le cellule epiteliali adiacenti.

Il fumo di sigaretta provoca cambiamenti significativi nell'architettura dell'epitelio delle vie aeree [35]. Tra questi cambiamenti vi sono la metaplasia squamosa, la sostituzione di cellule ciliate e secretorie differenziate con cellule squamose non presenti nelle vie respiratorie normali e l'iperplasia delle cellule mucipare, con conseguente ostruzione delle vie aeree provocata dall'aumentata secrezione di muco nel lume delle vie aeree [36]. Inoltre il numero

di cellule ciliate ridotto presenta ciglia più corte e meno mobili, provocando una minore efficienza nell'eliminazione di patogeni respiratori [36,37].

L'iperplasia delle cellule mucipare indotta dal fumo nelle piccole vie aeree è accompagnata dalla perdita di cellule di Clara, una popolazione di cellule secretorie arricchita nelle vie aeree distali e responsabile della produzione di secretoglobina, proteine tensioattive e altri fattori di difesa dell'ospite [38].

Inoltre, il fumo di sigaretta compromette le difese antimicrobiche epiteliali delle vie aeree attraverso la soppressione del fattore nucleare (NF)- κ B, fattore di trascrizione che gioca un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria [39] e l'inibizione delle vie molecolari necessarie per la produzione di interferone in risposta a infezione virale [40]. Inoltre, il fumo aumenta la permeabilità dell'epitelio delle vie aeree [41] down-regolando il programma trascrizionale responsabile della formazione della barriera giunzionale, che è ulteriormente soppressa nei fumatori con BPCO [42].

Macrofagi alveolari

I macrofagi alveolari sono localizzati sulla superficie dell'epitelio respiratorio e sono direttamente esposti all'ambiente esterno. Rappresentando la componente monocitica polmonare, sono responsabili delle difese dell'ospite attraverso il riconoscimento e la fagocitosi di patogeni e cellule apoptotiche. A seconda del tipo di stimolo possono rilasciare citochine pro-infiammatorie e fattori antimicrobici ("attivazione classica" o polarizzazione M1) o produrre fattori anti-infiammatori e di remodeling tissutale importanti per la risoluzione dell'infiammazione e la riparazione del tessuto (polarizzazione M2) [43].

Il numero di macrofagi alveolari è significativamente maggiore nei polmoni di fumatori e di pazienti con BPCO, nei quali tendono ad accumularsi in aree enfisematose, ed è correlato con l'ostruzione delle vie aeree e la gravità della malattia [44]. Secondo un crescente numero di evidenze l'aumento di queste cellule in pazienti fumatori sani e con BPCO è accompagnato da una consistente soppressione delle funzioni di difesa di queste cellule. Ad esempio, macrofagi alveolari isolati da individui con BPCO mostrano una capacità ridotta di fagocitare i batteri che si trovano comunemente nel polmone di questi soggetti, come *H. influenzae* [45].

Cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (DC) sono cellule mononucleari che partecipano all'immunosorveglianza attraverso il riconoscimento, la cattura e la presentazione di antigeni.

Le DC delle vie aeree risiedono adiacenti alle cellule epiteliali ed estendono i dendriti per campionare gli antigeni presenti nel lume. Quando queste cellule catturano un antigene migrano verso i tessuti linfoidei locali, come i linfonodi regionali o gli aggregati linfoidei mucosi, per la presentazione degli antigeni processati ai linfociti, dando inizio alla risposta immunitaria adattativa ai patogeni. Un aumento del numero di DC esprimenti CD207/Langerin, marker di DC immaturo, è stato osservato nelle piccole vie aeree dei pazienti con BPCO [46]. Il numero di DC maturi, come definito dall'espressione del marker di maturazione CD83, è invece significativamente ridotto nelle piccole vie aeree e negli alveoli dei fumatori con BPCO [47]. I fumatori con BPCO hanno fino 100 volte meno DC nell'epitelio bronchiale rispetto ai controlli sani e il numero di DC intraepiteliale delle vie aeree si normalizza dopo l'interruzione del fumo [48]. Coerentemente con ciò, l'esposizione al fumo di sigaretta diminuisce la frequenza e lo stato di attivazione delle DC polmonari e riduce la capacità di stimolare le cellule T e avviare risposte immunitarie antivirali [49].

Neutrofili

A differenza delle AM e DC, i neutrofili sono cellule immunitarie innate poco espresse nel tessuto polmonare, ma migrano rapidamente verso i siti di infezione o lesione in risposta a chemochine pro-infiammatorie rilasciate dalle cellule epiteliali e dai macrofagi alveolari. Una volta nel parenchima polmonare, i neutrofili fagocitano i batteri e rilasciano fattori antimicrobici e specie reattive dell'ossigeno che inattivano i patogeni. Tuttavia, questi mediatori possono anche danneggiare il tessuto dell'ospite se la risposta infiammatoria mediata dai neutrofili non è adeguatamente controllata. Nella BPCO la risposta mediata dai neutrofili ha conseguenze importanti sul tessuto polmonare, poiché l'aumento del numero di neutrofili non è accompagnato da un'efficace eliminazione dei batteri, contribuendo alla gravità dell'ostruzione delle vie aeree e dell'enfisema [50]. L'elastasi neutrofila, uno dei principali prodotti derivati dai neutrofili nei polmoni degli individui con BPCO, può causare molte caratteristiche patologiche della BPCO, inclusa la distruzione enfisematosa del tessuto polmonare [50].

Esistono prove che la funzione di difesa dell'ospite dei neutrofili è compromessa nella BPCO. I neutrofili isolati dal sangue di soggetti con BPCO da moderata a grave hanno mostrato una riduzione della chemiotassi in risposta alle chemochine classiche come la proteina batterica N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP) e la citochina pro-infiammatoria interleuchina IL-8 [51]. Inoltre, i neutrofili di individui con BPCO migrano più rapidamente di quelli di soggetti sani, ma l'accuratezza della migrazione verso segnali chemiotattici è notevolmente ridotta [52]. I

componenti del fumo di sigaretta inoltre possono inibire lo scoppio ossidativo e le capacità fagocitiche dei neutrofili [53].

Cellule Natural Killer

Le cellule Natural Killer (NK) sono un sottotipo delle ILC1 (cellule linfoidi innate tipo I) che svolgono un ruolo importante nella risposta innata, in particolare nel riconoscimento di cellule tumorali o infettate da virus. Il termine *natural killer* deriva dal fatto che la loro principale funzione è uccidere le cellule infettate, analogamente alle cellule killer del sistema immunitario adattativo, ovvero i linfociti T citotossici (CTL); tuttavia le cellule NK svolgono questa funzione senza subire alcuna differenziazione (da qui il termine *natural*). Le cellule NK costituiscono il 5-15% delle cellule mononucleate presenti nel sangue e nella milza. Negli altri organi linfoidi sono rare, ma sono più abbondanti in organi particolari quali fegato [54] e utero gravido [55]. Le cellule NK, a differenza dei linfociti T e B, non esprimono recettori per l'antigene distribuiti clonalmente; per distinguere le cellule normali dalle cellule infettate utilizzano infatti recettori codificati dal DNA della linea germinativa. Nel sangue possono essere riconosciute per l'espressione in membrana di CD56 e l'assenza di CD3, il marcatore dei linfociti T. Nell'uomo, la maggioranza delle cellule NK esprime anche CD16, che è coinvolto nel riconoscimento di cellule rivestite da anticorpi.

Funzioni effettrici delle cellule NK

Le funzioni effettrici delle cellule NK sono l'uccisione delle cellule infettate e la produzione di IFN- γ . I meccanismi di citotossicità delle cellule NK sono essenzialmente analoghi a quelli dei linfociti CD8⁺ citotossici. Le cellule NK, come i CTL, possiedono granuli che contengono le proteine responsabili dell'uccisione delle cellule bersaglio. Quando le cellule NK sono attivate, l'esocitosi dei granuli rilascia queste proteine in prossimità delle cellule bersaglio. Una proteina contenuta nei granuli delle cellule NK, chiamata *perforina*, agevola l'ingresso di altre proteine contenute nei granuli, i *granzimi*, nel citosol delle cellule bersaglio. I granzimi sono enzimi che avviano una sequenza di eventi di attivazione che causano la morte per apoptosi delle cellule bersaglio. Uccidendo le cellule infettate da virus e da batteri intracellulari, le cellule NK eliminano i serbatoi di microbi infettivi. Nella fase iniziale di un'infezione virale le citochine IL-12 e IL-15 inducono l'espansione e l'attivazione delle cellule NK e l'uccisione delle cellule infettate e questo evento precede l'attivazione dei linfociti CTL. Le cellule NK svolgono un ruolo rilevante anche dopo, nel corso dell'infezione virale, uccidendo le cellule infettate che sono sfuggite all'attacco dei CTL, con ridotta espressione delle molecole MHC di classe I. alcuni tumori, specialmente quelli di origine

ematopoietica, sono un tipico bersaglio delle cellule NK, verosimilmente proprio perché le cellule tumorali non esprimono normali livelli di molecole MHC di classe I.

L' IFN- γ prodotto dalle cellule NK aumenta la capacità dei macrofagi di uccidere i batteri fagocitati, analogamente all' IFN- γ prodotto dai linfociti T (Figura 2). Questa interazione NK-macrofago che dipende dall' IFN- γ è in grado di tenere sotto controllo un' infezione da batteri intracellulari come *Listeria monocytogenes* per diversi giorni o settimana, dando tempo alla risposta adattativa dei linfociti T di svilupparsi e di eradicare l' infezione. L' IFN- γ prodotto nei linfonodi dalle cellule NK può inoltre indirizzare la differenziazione dei linfociti T *naive* in cellule Th1. Alcune cellule NK umane non esprimono CD16 e sono citotossiche: queste cellule sono caratterizzate dalla capacità di produrre abbondanti quantità di IFN- γ . Come prevedibile, la deplezione delle cellule NK determina un aumento della suscettibilità alle infezioni da parte di alcuni virus e batteri intracellulari. Nei topi che presentano un deficit di linfociti T, la risposta delle cellule NK è sufficiente a tenere sotto controllo l' infezione da questi microbi per un certo periodo, ma in ultima analisi l' animale soccombe in assenza dell' immunità mediata dai linfociti T.

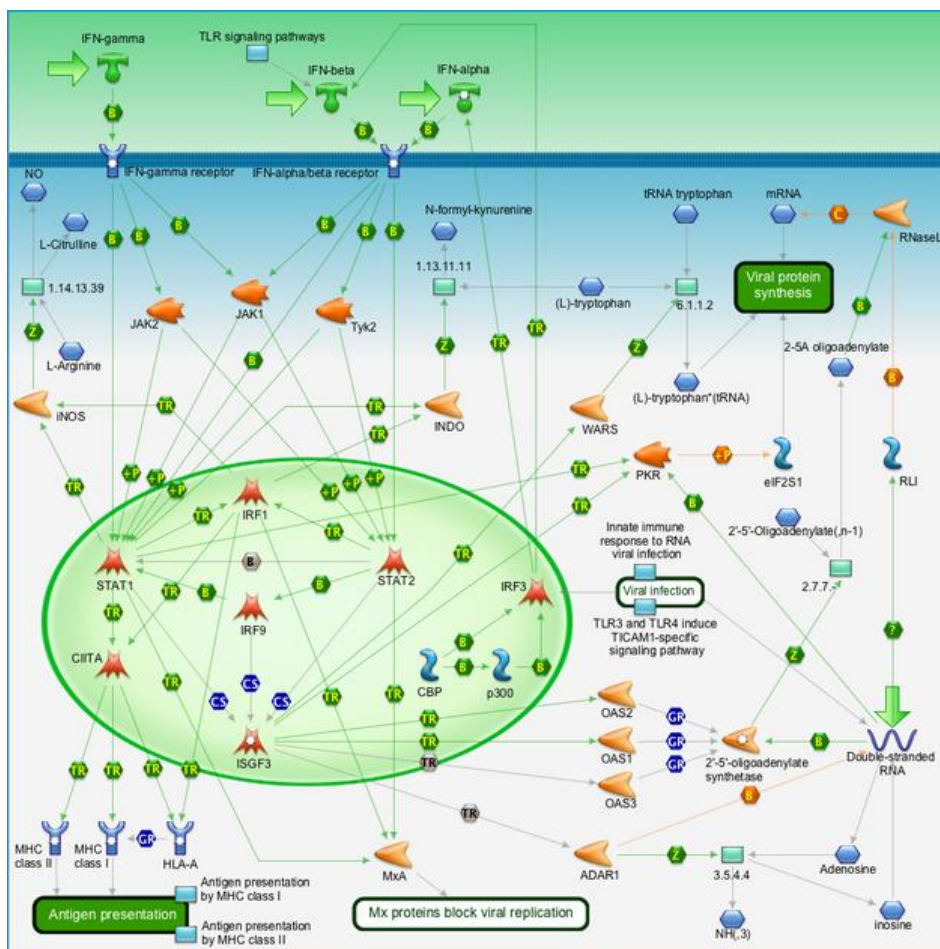


Fig.2 Azione antivirale degli interferoni (immagine di Bio-rad).

Recettori attivatori e inibitori delle cellule NK

Le cellule NK sono in grado di distinguere le cellule infettate e alterate da quelle sane. Le loro funzioni dipendono dall'equilibrio tra i segnali generati dai recettori attivatori e inibitori [56]. Questi recettori riconoscono molecole espresse da altre cellule e generano segnali che promuovono o inibiscono le risposte delle cellule NK. I recettori attivatori stimolano le proteine chinasi che trasducono il segnale mediante fosforilasi dei substrati a valle, mentre i recettori inibitori stimolano le fosfatasi che contrastano l'azione delle chinasi. In generale, i recettori attivatori riconoscono ligandi che sono presenti sulle cellule infettate e danneggiate, che devono essere eliminate, mentre i recettori inibitori riconoscono segnali espressi dalle cellule sane, che devono essere preservate. Il risultato dell'interazione di una cellula NK con una cellula bersaglio è determinato dall'integrazione dei segnali generati dal pannello di recettori inibitori e attivatori espressi dalla cellula NK che interagiscono con i ligandi presenti sulla cellula bersaglio. Il coinvolgimento dei recettori attivatori stimola l'uccisione da parte delle cellule NK dando luogo all'eliminazione delle cellule danneggiate o infette. Viceversa, il coinvolgimento dei recettori inibitori disattiva le funzioni effettrici delle cellule NK e previene l'uccisione delle cellule sane. Il pannello di recettori espresso dalle diverse cellule NK nei vari individui è molto variabile, dal momento che questi vengono espressi in maniera stocastica: perciò, le singole cellule NK anche nello stesso individuo possono rispondere a tipi diversi di microbi o cellule infettate. Inoltre, i geni che codificano per molti di questi recettori sono polimorfici (ovvero ne esistono molte varianti all'interno della popolazione) e dunque ciascun individuo esprimerà una forma di recettore leggermente diversa.

I recettori attivatori delle cellule NK riconoscono un gruppo eterogeneo di ligandi, alcuni dei quali possono essere espressi da cellule normali, mentre altri principalmente da cellule che hanno subito danni, cellule infettate da microbi o trasformate. Molti dei recettori attivatori delle cellule NK sono chiamati **recettori KIR** (*Killer cell immunoglobulin [Ig]-like Receptors*) poiché contengono un dominio strutturale Ig, inizialmente identificato negli anticorpi [57]. Tutte le proteine che possiedono domini Ig sono membri della superfamiglia delle Ig. Un secondo importante gruppo di recettori NK attivatori appartiene alla famiglia delle lectine di tipo C, che sono proteine con proprietà di legame ai carboidrati. Alcuni dei recettori attivatori riconoscono le molecole MHC di classe I, una proprietà importante che caratterizza i recettori inibitori, come vedremo più avanti. Altri recettori attivatori riconoscono ligandi diversi dalle classiche molecole MHC. Uno di questi, oggetto di studi approfonditi,

appartiene alla famiglia delle lectine di tipo C ed è chiamato NKG2D. Questo recettore si lega a proteine simili alle molecole MHC di classe I, fra cui MIC-A e MIC-B che sono espresse da cellule infettate da virus e cellule tumorali ma non da cellule normali. Il recettore NKG2D si associa ad una subunità di trasduzione chiamata DAP10, che invia segnali che promuovono la citotossicità delle cellule NK nei confronti delle cellule bersaglio. Un altro recettore attivatorio è CD16 (Fc γ RIIIA), un recettore a bassa affinità per le IgG, in particolare IgG1 e IgG3, e trasduce il segnale associandosi ad una delle tre diverse catene di attivazione. Gli anticorpi presentano una porzione variabile che lega l'antigene ed una porzione costante, detta regione Fc, che interagisce con varie molecole del sistema immunitario. Nel corso di un'infezione il sistema immunitario adattativo produce anticorpi IgG1 e IgG3 che legano gli antigeni microbici espressi sulla superficie delle cellule infettate e vengono riconosciuti da CD16 espresso dalle cellule NK. Di conseguenza, CD16 genera segnali che attivano le cellule NK a uccidere le cellule che sono state rivestite dagli anticorpi. Questo processo è chiamato *citotossicità cellulare-anticorpo-dipendente* e rappresenta una funzione effettrice dell'immunità adattativa.

Appartengono ai recettori attivatori anche i «recettori della citotossicità naturale» (natural cytotoxicity receptors, NCR), costituiti da NKp46, NKp30 e NKp44.

NKp46 è una glicoproteina transmembrana di 46 kDa caratterizzata da una coda intracellulare di 30 a.a., un dominio transmembrana di 20 a.a e due domini extracellulari di tipo Ig congiunti da un peptide corto di 25 a.a. [58]. Il dominio transmembrana contiene un residuo Arg che può legare in modo non covalente Fc ϵ R1 e CD3 ζ (Figura 3) [59].

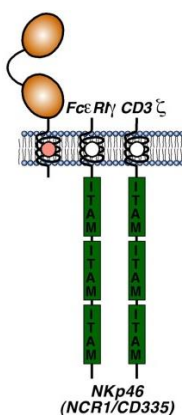


Fig.3 Struttura del recettore NKp46 [60]

Il legame del ligando con il recettore CD335 attiva le cellule NK, con l'aumento della produzione di IFN- γ e rilascio di granuli citolitici [61]. Sebbene siano ancora poco noti i un

ligandi per CD335, il recettore svolge un ruolo importante nel riconoscimento delle cellule tumorali da parte delle cellule NK e può legare specificamente le emoagglutinine virali, supportando il ruolo anti tumorale antivirale di queste cellule [62, 63, 64]

È stato anche dimostrato che NKp46 gioca un ruolo chiave nel riconoscimento e nella clearance dello *Streptococcus pneumoniae*, e che i topi con deficit di NKp46 hanno una ridotta attivazione di NK e minore produzione di interferone- γ (IFN- γ) durante il corso dell'infezione polmonare da *S. pneumoniae*. Al contrario, i topi che esprimono NKp46 sembrano dotati di potenti risposte da parte dei macrofagi alveolari rispetto ai topi con deficit di NCR1. Questo risultato è correlato alla più alta frazione di ligando NKp46 sui macrofagi polmonari nei topi che esprimono NCR1 che sono anche dotati di una migliore attività fagocitica rispetto a quella dei macrofagi che non interagiscono con NKp46 [65].

La maggior parte delle cellule NK esprime recettori inibitori che riconoscono molecole MHC di classe I, proteine di membrana normalmente espresse da tutte le cellule nucleate. La funzione principale delle molecole MHC di classe I è esporre sulla membrana peptidi che derivano da proteine citoplasmatiche endogene o microbiche, in modo che possano essere riconosciute dai linfociti T. Le cellule NK possono quindi discriminare le cellule normali, che esprimono le molecole MHC di classe I, e quelle infettate o alterate che tendono a perdere tale espressione. Di conseguenza, le cellule NK saranno inibite da cellule sane ma non riceveranno segnali inibitori da cellule infette o alterate. In questo caso la cellula si attiverà per il rilascio di citochine e l'uccisione della cellula infettata o alterata. La capacità delle cellule NK di essere attivate da cellule self che non esprimono MHC di classe I viene definita *riconoscimento del self mancante (missing self)*. La principale classe di recettori inibitori delle cellule NK sono i KIR, che si legano a una varietà di molecole MHC di classe I. Altri recettori inibitori sono i recettori lectinici, come l'eterodimero CD94/NKG2A, che riconosce una molecola MHC di classe I definita HLA-E. HLA-E lega peptidi che derivano da altre molecole MHC di classe I; pertanto, CD94/NKG2A è un recettore che rileva la presenza di diversi tipi di molecole MHC di classe I [66]. Una terza famiglia di recettori inibitori, chiamati recettori LIR (leukocyte Ig-like receptors) è composta da membri della superfamiglia delle Ig che si legano alle molecole MHC di classe I, anche se con minore affinità rispetto ai KIR, e sono maggiormente espressi dai linfociti B rispetto alle cellule NK [67].

I recettori attivatori e inibitori delle cellule NK contengono motivi strutturali nelle code citoplasmatiche, che innescano meccanismi di trasduzione che promuovono o inibiscono

l'uccisione delle cellule bersaglio e la secrezione delle citochine. I recettori attivatori presentano motivi **ITAM** (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs), che contengono residui di tirosina che, in seguito all'attivazione del recettore, vengono fosforilati da parte di chinasi citoplasmatiche. Altre proteine chinasi vengono reclutate dagli ITAM fosforilati e dopo attivazione fosforilano a loro volta ulteriori proteine, contribuendo alla cascata di eventi che porta in ultima analisi all'attività citotossica e alla secrezione di citochine [68]. Gli ITAM sono inoltre presenti nelle code citoplasmatiche di altre catene di trasduzione di recettori del sistema immunitario, fra cui il recettore per l'antigene dei linfociti T e B. In alcuni recettori attivatori, una singola catena polipeptidica contiene sia la sequenza ITAM sia la porzione di legame per il ligando. In altri, gli ITAM sono localizzati in catene polipeptidiche distinte, quali Fc ϵ RI γ , e DAP12, che non legano direttamente il ligando, ma che si associano in modo non covalente alla catena che interagisce con il ligando.

I recettori inibitori delle cellule NK presentano, nelle code citoplasmatiche, un motivo strutturale comune detto ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif), il quale ingaggia molecole che bloccano le vie di trasduzione dei recettori attivatori. I domini ITIM contengono i residui di tirosina che vengono fosforilati in seguito al riconoscimento del ligando. Questo porta al reclutamento e all'attivazione di fosfatasi che rimuovono i fosfati dalle proteine e dai lipidi attivati dai recettori attivatori, con conseguente blocco dei segnali trasmessi dai recettori attivatori.

I geni KIR sono polimorfi, ovvero ne esistono diverse varianti alleliche. Gli alleli vengono spesso ereditati in gruppi, detti *aplotipi*. Esistono due aplotipi KIR prevalenti e alcuni più rari. Gli aplotipi differiscono per il numero di recettori codificati e in particolare alcuni aplotipi comprendono un numero diverso di recettori attivatori rispetto ad altri.

Le citochine possono potenziare le risposte delle cellule NK. Le principali citochine del sistema immunitario innato che stimolano la funzione delle cellule NK sono IL-12, IL-15, IL-18 e gli interferoni di tipo I. Ciascuna di queste citochine potenzia l'attività citotossica e stimola la secrezione di IFN- γ indipendentemente dai recettori attivatori. Inoltre, IL-12 e IL-15 sono importanti fattori di crescita per le cellule NK.

Durante i loro stadi di maturazione le cellule NK secernono anche una serie di citochine, tra cui IFN- α , TNF- α , IL-10 e IL-12 ad azione proinfiammatoria ed immunosoppressoria.

Le cellule NK rappresentano inoltre un collegamento tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa, attraverso interazioni bidirezionali con le cellule dendritiche (DC). Agli inizi

della reazione immunitaria (i.e., antitumorale), dopo l'incontro con cellule tumorali le cellule DC immature secernono TNF- α e inducono l'attivazione dei linfociti NK.

La maggior parte delle NK in circolo nel sangue è costituita da cellule mature CD16⁺ in grado di uccidere direttamente i loro bersagli ma con una scarsa capacità proliferativa ; viceversa, nei linfonodi sono presenti cellule NK meno mature CD16⁻ ma con un'elevatissima capacità di proliferare in presenza di specifici mediatori chimici come le interleuchine [69].

Cellule NK nella BPCO

Le cellule NK sono state oggetto di numerosi studi sul loro possibile ruolo nell'insorgenza e nella progressione della BPCO. Un'alterazione della loro attività citotossica potrebbe essere in grado di provocare danno tissutale e favorire il processo di flogosi nelle vie aeree. Sussistono evidenze contrastanti secondo cui il fumo di sigaretta diminuisce [70, 71], aumenta [72] o non ha alcun effetto [73] sull'attività citotossica delle NK.

Il fumo di sigaretta sulle NK sembra avere un effetto negativo sull'attività cellulare, riducendo la produzione di IFN- γ e TNF- α , l'espressione di perforina e l'attività citotossica di queste cellule [74]. È stato inoltre dimostrato un aumento delle cellule NK in fluido di lavaggio broncoalveolare da pazienti con BPCO rispetto a fumatori e non fumatori sani, dato che non si normalizza nei soggetti con BPCO che smettono di fumare [75].

Sebbene il numero di cellule NK nel sangue periferico, BALF e parenchima polmonare di pazienti con BPCO risulti essere invariato rispetto ai fumatori senza BPCO [76, 77], è stato riscontrato un aumento significativo delle cellule NK CD57⁺ citotossiche nei follicoli linfoidi polmonari di pazienti con BPCO rispetto ai fumatori senza BPCO [78]. Le cellule NK mostrano anche una iper-responsività nella BPCO, come emerso dallo studio condotto da Freeman e collaboratori, in cui le cellule NK CD56⁺ CD16⁺ uccidono le cellule parenchimali polmonari autologhe, in particolare le cellule epiteliali CD326⁺, favorendo lo sviluppo di enfisema polmonare [79].

Anche Hodge et al. [80] hanno dimostrato che nel sangue dei pazienti con BPCO non vi sono stati cambiamenti significativi nella proporzione di cellule NK o NKT-like, mentre risulta aumentata nel BALF e associata ad un aumento della citotossicità NK, ad una maggiore espressione del granzima B e ad una ridotta espressione del recettore inibitorio CD94 da entrambi i tipi di cellule. Queste recenti evidenze supportano l'idea che le strategie di trattamento che colpiscono le cellule NK e NKT-like, la loro citotossicità e la produzione di mediatori infiammatori nelle vie aeree possono migliorare la morbilità della BPCO.

IMMUNITA' ADATTATIVA NELLA BPCO

Nella BPCO non solo il sistema immunitario innato risulta compromesso, ma anche quello adattivo [81, 82]. Tali risposte immunitarie indebolite possono provocare infezioni ricorrenti, con conseguente aggravamento della malattia [83, 84]. Modelli murini sono stati utilizzati per valutare gli effetti di irritanti cronici come il fumo di sigaretta e la nicotina sulla risposta immunitaria adattiva. L'esposizione cronica di topi alla nicotina provoca anergia delle cellule T [85], mentre l'esposizione cronica al fumo di sigaretta e un'alta dose di virus influenzale provocano nel topo risposte immunitarie meno efficaci, con riduzione del tasso di sopravvivenza [86].

Linfociti T

I linfociti T giocano un ruolo centrale nella immunità cellulo-mediata. Sono caratterizzati dalla presenza di uno specifico recettore espresso sulla loro superficie chiamato recettore delle cellule T (T cell receptor, TCR) associato a un insieme di molecole che formano un'unità strutturale, nota come CD3. Si possono identificare varie sottopopolazioni di cellule T, alcune delle quali svolgono un ruolo adiuvante (i cosiddetti T helper/inducer), mentre altre possiedono caratteristiche citotossiche. Oltre al marcatore CD3, i linfociti T helper (Th) sono caratterizzati funzionalmente anche da un'altra glicoproteina transmembrana nota come CD4, in grado di interagire con la porzione laterale del complesso recettore TCR-MHC di classe II e necessaria, insieme al CD3, per la trasduzione del segnale di riconoscimento dell'antigene. I linfociti T ad azione citotossica hanno invece sulla membrana, oltre al CD3, un'altra componente glicoproteica nota come CD8, che interagisce con la porzione laterale del complesso recettore TCR-MHC di classe I.

Il fumo di sigaretta, gli agenti batterici o virali, i prodotti di decomposizione della matrice extracellulare e i possibili autoantigeni del tessuto polmonare possono stimolare risposte immunitarie adattive nei polmoni dei pazienti con BPCO, con la partecipazione di cellule T citotossiche CD8⁺, cellule T helper-1 e Th-17 CD4⁺ [87, 88] e di cellule B secernenti anticorpi [89]. Il numero di cellule T CD8⁺ polmonari aumenta sostanzialmente con stadi più elevati di limitazione del flusso d'aria ed enfisema [88]. Le cellule T CD8⁺ rilasciano enzimi proteolitici come perforina e granzimi, che provocano la morte cellulare delle cellule strutturali per apoptosi o necrosi [87, 89, 90]. Kim et al. [91] hanno dimostrato che l'aumentata espressione di granzima B nelle cellule CD8⁺ e non CD8⁺ è responsabile del

rimodellamento della parete delle piccole vie aeree nell'enfisema centrolobulare, suggerendo un possibile ruolo nella patogenesi della BPCO.

Il numero di cellule CD4 + risulta aumentato nelle vie aeree e nei polmoni dei fumatori con BPCO. Due tipi di cellule CD4 + si accumulano nei polmoni di pazienti con BPCO stabili, cellule Th1 e Th17 [92–94]. Le cellule Th1 secernono più interferone γ , mentre le cellule Th17 regolano l'infiammazione dei tessuti producendo IL-17A e IL-17F [94]. Le citochine Th17 inducono le cellule epiteliali a produrre peptidi antimicrobici, chemochine e fattori di crescita dei granulociti G-CSF e GM-CSF per promuovere l'accumulo di neutrofili nel sito della lesione. I pazienti con BPCO hanno un numero aumentato di IL-23 e IL-17 nell'epitelio bronchiale. Al contrario, i fumatori con BPCO hanno molto meno cellule T-regolatorie (TREG) nei polmoni e livelli più bassi di IL-10. Le TREG sono sottogruppi di cellule CD4⁺ con funzioni immunoregolatorie. Inibiscono l'autoimmunità e sopprimono l'infiammazione. Esercitano inoltre il loro effetto soppressivo su altre cellule T o cellule dendritiche presentanti l'antigene attraverso la produzione di citochine antinfiammatorie come IL-10 e TGF β [95].

Linfociti B

I linfociti B sono cellule del sistema immunitario responsabili della risposta umorale nell'immunità acquisita. La principale caratteristica dei linfociti B è quella di produrre anticorpi contro uno specifico antigene. Una volta che l'antigene è stato debellato rimane una piccola popolazione di cellule di memoria che, grazie alla loro lunga vita, sono pronte a rispondere ad ogni successiva esposizione al medesimo antigene.

Hogg et al. [89] hanno dimostrato che il numero di cellule B infiltranti e la percentuale di piccole vie aeree contenenti follicoli linfoidi ricchi di cellule B risultano entrambi associati alla gravità della BPCO. Un aumento della conta delle cellule B è stato successivamente riportato anche a livello delle grandi vie aeree nella BPCO [96]. Nella BPCO risultano aumentati a livello polmonare anche i linfociti B memoria e plasmacellule secernenti Ig rispetto ai controlli sani [97, 98]. L'aumentata conta delle cellule B nei polmoni della BPCO umana è associata a un'elevata sintesi di IgA. Tuttavia, l'espressione del recettore che trasloca le Ig polimeriche dallo spazio sottomucoso al lume delle vie aeree (pIgR) è sottoregolata nella BPCO e i livelli di espressione sono correlati inversamente all'infiammazione e al rimodellamento delle vie aeree e alla progressione della malattia [99-101]. Questi risultati suggeriscono che l'immunità della mucosa mediata da IgA è compromessa nella BPCO e contribuisce alla progressione della BPCO.

SCOPO DEL LAVORO

La principale causa di esacerbazioni della BPCO sono le infezioni ricorrenti del tratto respiratorio. L'integrità delle risposte immunitaria innata e adattiva è essenziale per creare una risposta efficiente ai patogeni. È possibile che nella BPCO possa verificarsi una risposta immunitaria squilibrata alle infezioni microbiche correlabile con l'estensione dell'infiammazione e il rimodellamento strutturale delle vie aeree periferiche. Una risposta immunitaria innata compromessa potrebbe avere importanti conseguenze sullo stato della malattia, attraverso un aumento delle esacerbazioni, un maggior impatto dei sintomi e un declino della funzione polmonare. L'obiettivo di questo studio è di individuare eventuali alterazioni dell'immunità innata in pazienti sani fumatori e con BPCO e capire come queste alterazioni possano partecipare all'insorgenza e alla progressione della malattia. Saranno quindi valutati alcuni profili cellulari e molecolari dell'immunità innata coinvolti nelle infezioni microbiche spesso causa di esacerbazioni. Partendo dalle biopsie di tessuto polmonare, verrà valutata, attraverso analisi immunoistochimica, l'espressione di cellule NK, principale componente cellulare dell'immunità innata con attività citotossica, e di due molecole coinvolte nella cascata innescata dagli interferoni, essenziali per un'adeguata risposta antimicrobica: il fattore di trascrizione IRF3 e il recettore citoplasmatico MDA-5.

MATERIALE E METODI

Questo progetto di ricerca deriva da una collaborazione tra i centri di ricerca del dipartimento di medicina interna dell'Università di Genova, e i dipartimenti di malattie respiratorie dell'Università di Ferrara e dell'Università di Padova.

Popolazione dello studio

Criteria di inclusione ed esclusione

L'analisi è stata eseguita su campioni polmonari raccolti da pazienti con indicazioni chirurgiche adeguate: trapianto polmonare, LVRS (riduzione del volume polmonare in soggetti con grave enfisema), resezioni polmonari per noduli periferici.

Per il gruppo di controllo sono stati arruolati soggetti fumatori e non fumatori con normale funzionalità polmonare destinati a resezione di nodulo periferico. Per il gruppo dei soggetti con BPCO invece il criterio di ammissione utilizzato è stato il grado di ostruzione irreversibile del flusso aereo valutato attraverso esame spirometrico ($FEV_1/FVC < 70\%$ post broncodilatatore).

Criteria di inclusione: Sono stati inclusi nello studio tutti i pazienti che necessitavano di sottoporsi ad una resezione polmonare o ad una biopsia polmonare per via chirurgica a scopo diagnostico o terapeutico nell'Azienda Ospedaliera Universitaria S. Anna di Ferrara.

Criteria di esclusione: storia pregressa di asma o rinite allergica, eventuale trattamento con farmaci immunosoppressori (ciclosporina, metotressato, ciclofosfamide, azatioprina) o radio/chemioterapia nei 6 mesi precedenti l'intervento chirurgico.

Lo studio rispetta la dichiarazione di Helsinki e ogni partecipante ha inoltre firmato il consenso informato. Gli appositi organi istituzionali hanno rilasciato l'approvazione etica per lo studio di campioni chirurgici e biopsici raccolti a scopo diagnostico e terapeutico routinario.

Esami a cui sono stati sottoposti i soggetti dello studio

Ogni paziente prima dell'intervento di chirurgia toracica è stato caratterizzato, come da normale routine pre-operatoria, dal punto di vista clinico, funzionale e di immagini toraciche. Infatti in tutti i pazienti sono stati eseguiti i seguenti accertamenti: anamnesi (sono stati annotati accuratamente anche tutti i farmaci assunti negli ultimi 2 mesi da ogni paziente) ed

esame obiettivo, questionario CECA (CECA 1971), tomografia computerizzata (TC) del torace con o senza somministrazione di mezzo di contrasto, e prove di funzionalità respiratoria (spirometria completa prima e dopo 15 minuti dalla somministrazione per via inalatoria di 400 µg di salbutamolo attraverso un aerosol predosato connesso ad un distanziatore). La tomografia computerizzata del torace è stata eseguita come esame routinario standardizzato in quanto parte degli accertamenti necessari per diagnosticare e stadiare la gravità della patologia polmonare ed è eseguita in fase pre-operatoria.

Tomografia computerizzata del torace

La tomografia computerizzata, in radiologia, indicata con l'acronimo TC o CT (dall'inglese computed tomography), è una tecnica di indagine radiodiagnostica (diagnostica per immagini), in cui i dati raccolti dal passaggio di vari fasci di raggi X nell'area interessata sono rielaborati al computer, in modo da ricostruire un'immagine tridimensionale dei diversi tipi di tessuto. È nota anche come tomografia assiale computerizzata o TAC (in inglese CAT da computed axial tomography), in quanto tempo fa l'esame era condotto lungo un solo asse, con sezioni perpendicolari alla lunghezza del corpo. Oggi, grazie ai moderni macchinari multistrato, la tomografia computerizzata non è più solo assiale, ma le immagini sono acquisite con una tecnica a spirale, facendo scorrere il lettino su cui si trova il paziente, che permette di ottenere immagini tridimensionali. Pertanto il termine TAC è divenuto improprio e obsoleto.

Intervento chirurgico

La chirurgia toracica in videotoracosopia o toracotomia rappresenta l'intervento di scelta per la diagnosi ed il trattamento di numerose patologie polmonari che vanno dal nodulo polmonare solitario, al carcinoma polmonare, ad altre neoplasie polmonari ed interstiziopatie polmonari.

Durante l'intervento chirurgico vengono asportati, a scopo diagnostico, tessuti polmonari e bronchiali francamente patologici con attorno una quantità più o meno grande (a seconda del tipo di intervento chirurgico necessario) di tessuto polmonare e bronchiale microscopicamente indenne. In parallelo, si provvede a selezionare una piccolissima frazione del tessuto polmonare e/o bronchiale perilesionale resecato durante l'intervento chirurgico che verrà immediatamente fissata in formalina/paraffina. Tale tessuto verrà utilizzato per l'analisi di questo studio.

Inclusione in paraffina

I campioni chirurgici sono stati prelevati a livello del parenchima subpleurico e fissati in formaldeide al 10% (4 ore) e in formaldeide al 4% (14-20 ore: in totale, l'immersione in formaldeide deve durare non meno di 18 ore e non più di 24 ore). Poi si è passati alla fase di disidratazione con alcool etilico a concentrazione crescente (70% per 30 minuti, 90% per 30 minuti, 100% con tre immersioni successive di 45 minuti, overnight e 45 minuti) e alla diafanizzazione con xilolo (tre immersioni successive di 45 minuti ciascuna). Dopo aver eliminato accuratamente lo xilolo, i campioni sono stati inclusi in paraffina (immersione in paraffina liquida a +60°C per 3 ore). Dal blocchetto così ottenuto, sono state quindi ricavate sezioni di 4 µm di spessore, che sono state processate con tecniche di immunoistochimica.

Colorazione immunoistochimica (IHC)

Sparaffinatura dei campioni

Si preparano due bagni di xilene e vi si immergono i vetrini con la fettina di tessuto per alcuni minuti, 15 minuti per il primo bagno e 5 minuti per il secondo. È opportuno prima di procedere verificare che la paraffina sia del tutto disciolta.

Reidratazione

Occorre reidratare la fettina prima di procedere con la colorazione, passando per la “serie discendente degli alcoli”. Si preparano quindi diverse vaschette ciascuna contenenti gradazioni di alcol decrescenti, dal 100% al 70%, procedendo con bagni da 5 minuti ciascuno. L'ultimo bagno da 5 minuti viene effettuato in acqua distillata.

Smascheramento antigenico

Per facilitare il riconoscimento degli epitopi da parte degli anticorpi è necessario operare lo smascheramento antigenico con Antigen Unmasking Solution (Vector h-3300) diluito 1:10 in acqua distillata, a 98°C per 30 minuti.

Colorazione per IRF3 e MDA5

Le sezioni di tessuto sono state incubate per 20 minuti con un blocking serum (di capra per MDA5 o di cavallo per IRF3) per bloccare i siti di legame non specifici. Al fine di migliorare la permeabilità cellulare, il blocking serum è stato diluito in PBS/saponina allo 0.1%. Il PBS è un tampone fosfato salino che mantiene costante il pH.

In seguito, le sezioni sono state incubate per un'ora con un anticorpo di coniglio anti-MDA5 umano (diluito 1:200) o con un anticorpo di topo anti-IRF3 umano (diluito 1:25), sempre diluiti in PBS/saponina allo 0.1%. Dopo lavaggi con PBS/saponina, le sezioni sono state incubate per 30 minuti con un anticorpo secondario biotinilato (rispettivamente, IgG anti-coniglio o IgG anti-topo) diluito in PBS/saponina. Dopo ulteriori lavaggi con PBS/saponina, le sezioni sono state incubate per 30 minuti con il reagente ABC, contenente avidina e perossidasi: l'avidina si lega alla biotina presente nell'anticorpo secondario e la perossidasi catalizza una reazione che ha come substrato la DAB aggiunta nel passaggio successivo.

Infatti, dopo gli ultimi lavaggi con PBS/saponina, sulle sezioni è stato aggiunto il cromogeno DAB (3, 3'-diaminobenzidina), che conferisce una colorazione marrone alle cellule e ai tessuti contenenti l'antigene che si sta cercando, in questo caso MDA5 (colorazione DAB di 45 secondi) o IRF3 (colorazione DAB di 2 minuti). Infine è stata effettuata una colorazione di contrasto con ematossilina per visualizzare i nuclei.

Colorazione per NKp46⁺

Per l'identificazione delle cellule NK mediante immunistochemica è stato scelto un anticorpo monoclonale anti-CD335, una glicoproteina transmembrana da 46 kDa anche nota come NKp46. Questa glicoproteina è un membro della superfamiglia delle immunoglobuline caratterizzata da due domini Ig-like extracellulari di tipo C2. NKp46 è considerata il prototipo dei recettori della citotossicità naturale NK (NCR) e la sua espressione è limitata a tutte le cellule NK a riposo e attivate. Rappresenta infatti un importante recettore attivatore e svolge un ruolo centrale nella lisi e nella clearance delle cellule HLA di classe I

Le sezioni di tessuto sono state trattate con il Kit Cell & Tissue Staining (R&D systems), che include i reagenti necessari per il blocco delle perossidasi endogene ed un sistema immunometrico basato sull'interazione streptavidina-biotina. In particolare, in seguito al blocco delle perossidasi endogene, le sezioni sono state incubate con anticorpo monoclonale "Human NKp46/NCR1 MAb" (Bio-technie) diluito 1:50 per un'ora a temperatura ambiente, seguita da un'ora di incubazione con anticorpo secondario biotinilato. Successivamente è stata aggiunta Streptavidina-HRP a ciascuna sezione di tessuto, seguita dalla colorazione con cromogeno DAB. Infine è stata effettuata una colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer (10 minuti) per visualizzare i nuclei.

Montaggio del preparato

Disidratazione e diafanizzazione

Terminata la colorazione si sciacqua la sezione in acqua distillata e si disidrata passandola per la serie ascendente degli alcoli, con le stesse modalità, fino ad arrivare allo xilene.

Montaggio in balsamo

Dopo aver diafanizzato in xilene, si procede a versare una o due gocce di “montante” e si copre il tutto con il vetrino coprioggetti, evitando che si formino bolle d’aria e. Si attende che il montante si sia distribuito uniformemente tra i due vetrini, eventualmente esercitando una lieve pressione, e si lascerà asciugare a temperatura ambiente per alcune ore.

Analisi microscopica

L’analisi microscopica è stata condotta con microscopio Leica DM2000 connesso ad un sistema di registrazione video collegato ad un sistema computerizzato di analisi dell’immagine (LAS Leica).

Sezioni colorate per IRF3 e MDA5

Le analisi sono state eseguite esaminando almeno 20 campi microscopici per vetrino, ad ingrandimento 400x, selezionando in maniera sistematica 1 campo ogni 4 visualizzati, così da esplorare la maggior parte del tessuto a disposizione. Per ciascun campo microscopico (high power field-hpf) è stato quantificato il numero di macrofagi alveolari totali (esprimendo il risultato come macrofagi/hpf) e il numero di macrofagi alveolari positivi per il marcatore specifico (MDA5, IRF3). Si è poi rapportato il numero totale di cellule positive contate nel vetrino al numero totale di macrofagi alveolari visualizzati, normalizzando per un fattore 100. I risultati finali sono stati quindi espressi come percentuale di macrofagi positivi sul numero dei macrofagi totali.

Sezioni colorate per Nkp46

I dati finali sono stati ottenuti attraverso analisi in microscopia ottica con microscopio ottico Leica integrato con videocamera DFC 320 e software Leica Qwin.

Il numero di cellule Nkp46⁺ presenti in ciascun campione istologico è ottenuto fotografando l’intera sezione di tessuto, acquisendo ciascun campo ad un ingrandimento 100x (Figura 4). Il numero di cellule positive rilevate è rapportato all’area netta di tessuto totale (espressa in

mm²) ottenuta per ricostruzione a mosaico dell'intera sezione di tessuto (operata dal software Qwin).

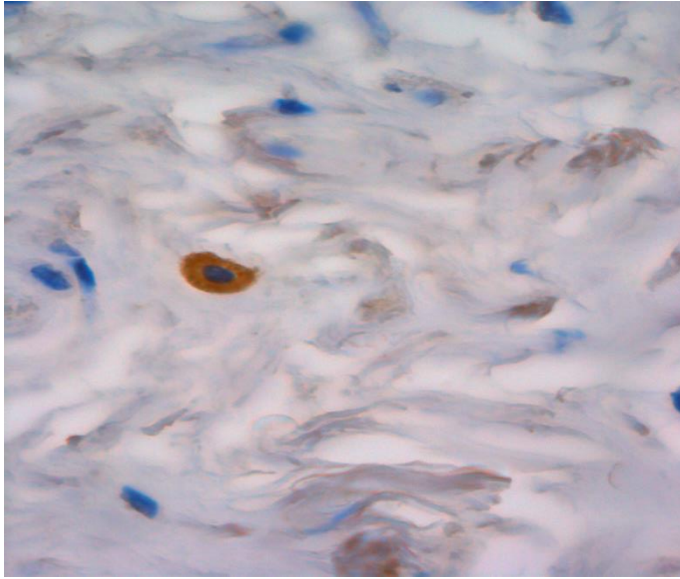


Fig. 4 Cellula NKp46⁺. Immagine acquisita ad ingrandimento 100x

RISULTATI

Nello studio sono stati inclusi 57 pazienti, arruolati presso il centro di Pneumologia dell'Università degli studi di Ferrara e il centro di Pneumologia dell'Università degli studi di Padova. I pazienti sono stati poi suddivisi utilizzando come criteri l'abitudine tabagica e la presenza o meno di ostruzione al flusso aereo.

I soggetti selezionati per lo studio sono stati suddivisi in tre gruppi:

- 15 pazienti controllo non fumatori con normale funzionalità respiratoria
- 21 pazienti fumatori con normale funzionalità respiratoria
- 21 pazienti con Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva

Le caratteristiche della popolazione sono riportate in tabella 4 e 5.

| | BPCO | Fumatori con normale funzionalità respiratoria | Non fumatori con normale funzionalità respiratoria |
|--------------------------------|-------------|---|---|
| Popolazione | 21 | 21 | 15 |
| Età Media | 69 | 68 | 71 |
| Dev. std Età | 7,95 | 8,94 | 5,97 |
| Maschi | 16 | 14 | 9 |
| Media di Pack-years | 41 | 36 | 0 |
| Dev. std Pack Years | 22 | 21 | 15 |
| Pazienti con Bronchite Cronica | 11 | 1 | 0 |

Tabella 4. Caratteristiche della popolazione studiata: pazienti totali ($n=58$), pazienti con Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) ($n=22$), pazienti non fumatori con normale funzionalità respiratoria ($n=15$), pazienti fumatori con normale funzionalità respiratoria ($n=21$)

| | BPCO | Non fumatori |
|-----------------------------------|-------------|---------------------|
| Media di FEV ₁ | 66,73% | 105,83% |
| Dev. standard di FEV ₁ | 24,61% | 11,92% |

Tabella 5. Caratteristiche funzionalità respiratoria soggetti con BPCO e Non fumatori.

Espressione di cellule NKp46⁺

Grazie all'analisi d'immagine è stato possibile contare le cellule NKp46⁺ presenti nelle sezioni di tessuto polmonare dei pazienti con BPCO, dei pazienti fumatori non ostruiti e dei pazienti non ostruiti e non fumatori. I risultati mostrano un aumento significativo del numero di NK nei pazienti con BPCO rispetto ai pazienti non ostruiti e non fumatori ($p < 0.001$). Il numero di NK risulta mediamente maggiore anche nei pazienti fumatori non ostruiti rispetto ai non fumatori non ostruiti. Il numero di cellule NKp46⁺ per mm² ottenuto è riportato nel grafico (Figura 5).

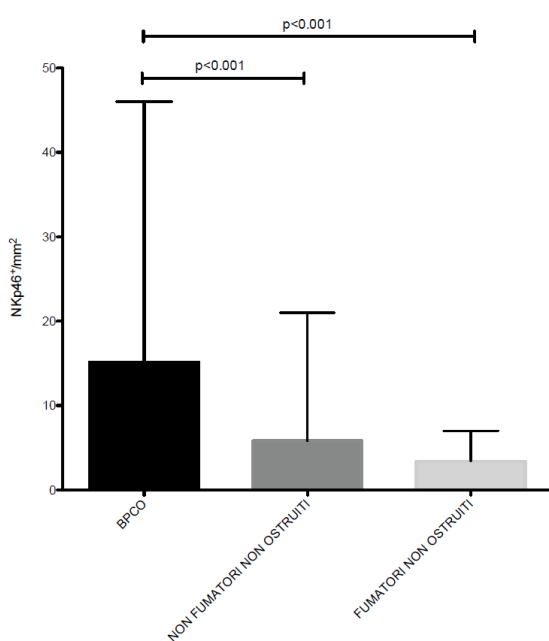


Fig.5 Numero di cellule NKp46⁺/mm² di tessuto. Ciascuna colonna indica la media del numero di cellule NK contate in ciascun gruppo di studio e il relativo range.

Espressione del fattore di trascrizione IRF-3

È stata studiata l'espressione di IRF3 nei macrofagi, essendo importante nella regolazione della risposta immunitaria innata in seguito all'esposizione ad un agente virale, determinando la trascrizione di una serie di fattori implicati nella risposta immunologica tra cui, in particolare, il gene IFN di tipo I responsabile della produzione di IFN α e β . Aumentati livelli di IRF3 sono stati riscontrati nel gruppo dei pazienti fumatori non ostruiti rispetto al gruppo dei non fumatori ($p < 0.05$). Non è stata documentata differenza significativa invece tra il gruppo dei pazienti BPCO e quello dei fumatori non ostruiti ($p > 0.05$) (Figura 6).

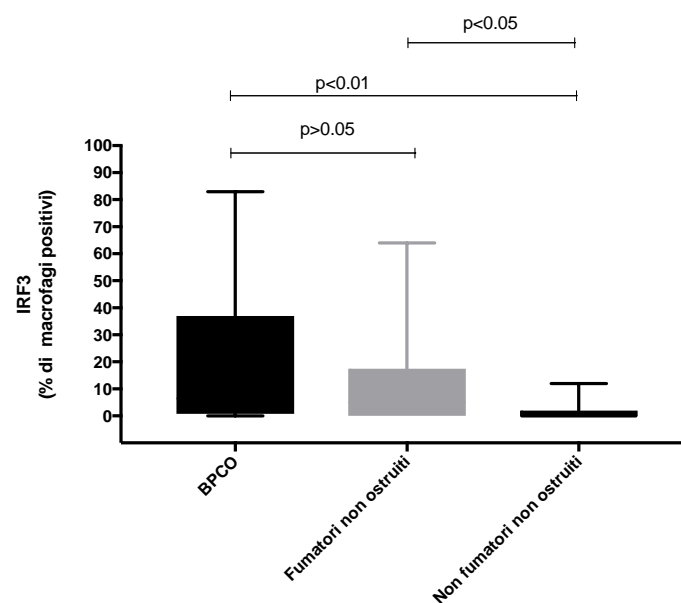


Fig.6 Livelli di espressione del fattore di trascrizione IRF3. Ogni barra indica i livelli di espressione di IRF3 riscontrati nei macrofagi dei pazienti appartenenti a ciascun gruppo.

Inoltre, è stata valutata l'espressione di IRF3 in base all'espressione clinica della malattia. I pazienti con BPCO sono stati suddivisi in sottogruppi, considerando la compromissione della funzionalità respiratoria da un punto di vista spirometrico (pazienti con $FEV_1 > 80\%$ o $FEV_1 < 80\%$), la presenza di bronchite cronica o la presenza di entrambe le variabili contemporaneamente. I risultati documentano una riduzione, anche se non statisticamente significativa ($p > 0.05$), tra i livelli di IRF3 nei soggetti con $FEV_1 < 80\%$ e i soggetti con bronchite cronica. La riduzione dei livelli di IRF3 risulta statisticamente non significativa anche mettendo a confronto sia i soggetti con $FEV_1 > 80\%$ e quelli con $FEV_1 < 80\%$ che i soggetti con bronchite cronica con quelli senza bronchite cronica (Figura 7). Confrontando

nel gruppo dei BPCO i soggetti caratterizzati da bronchite cronica e FEV1 < 80% con quelli senza bronchite cronica e con FEV1 > 80% si può apprezzare una riduzione significativa dei livelli di IRF3 ($p < 0.05$) (Figura 8).

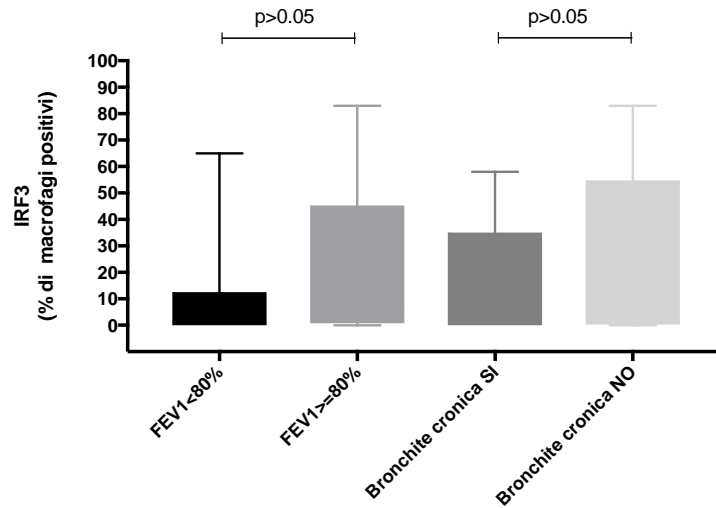


Fig.7 Livelli di espressione di IRF3. Ogni barra indica i livelli di espressione di IRF3 riscontrati nei macrofagi dei pazienti con BPCO, evidenziando livelli di espressione di IRF3 diversi a seconda del sottogruppo.

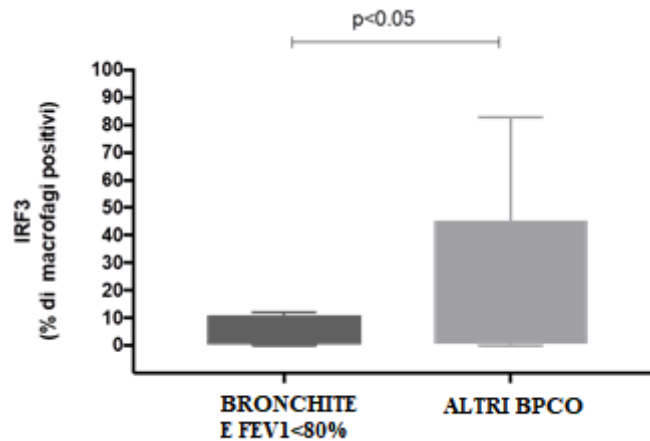


Fig.8 Livelli di espressione di IRF3. Le due barre indicano i livelli di espressione di IRF3 riscontrato nei macrofagi dei pazienti con BPCO. In particolare appare evidente una riduzione dei livelli di espressione del recettore nei pazienti con BPCO ostruiti e con bronchite cronica.

Espressione del recettore citosolico MDA5

È stata valutata l'espressione di MDA5 in quanto, secondo le più recenti evidenze scientifiche, sembra avere anch'esso un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria innata. MDA5 è un recettore citoplasmatico facente parte della famiglia dei RIG-I-LIKE receptors con una spiccata affinità per gli antigeni virali. L'attivazione del dominio CARD innesca una reazione a cascata che ha come target finale la trascrizione di alcuni geni implicati nella risposta immunitaria innata come quello dell'Interferone, dell'IL-8 e dell'IL-6.

Considerando i tre gruppi oggetto di studio, i livelli di MDA5 nei macrofagi risultano invariati nei macrofagi considerando i tre gruppi oggetto di studio (Figura 9).

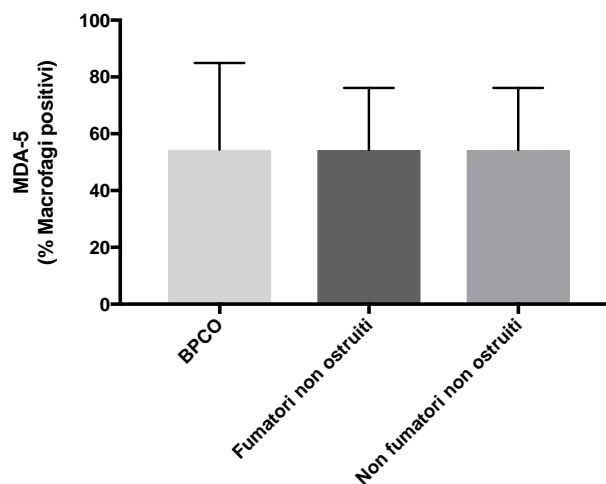


Fig.9. Livelli di espressione del recettore citoplasmatico MDA5. Ogni barra indica i livelli di espressione di MDA5 riscontrato nei macrofagi dei pazienti appartenenti a ciascun gruppo oggetto di studio.

I livelli di MDA5 sono stati inoltre valutati in base all'espressione di malattia dei pazienti. I pazienti sono stati stratificati in base al grado di ostruzione delle vie aeree mediante un accurato studio spirometrico che ha suddiviso i pazienti in due gruppi sulla base del cut-off della FEV₁ (FEV₁<80% e FEV₁>80%). Utilizzando poi come parametro clinico la presenza o meno di bronchite cronica è stato possibile stratificare ulteriormente i pazienti. È stato inoltre eseguito un confronto unendo più variabili contemporaneamente.

I risultati mostrano una minore espressione di MDA5 nei soggetti con FEV₁< 80% rispetto ai soggetti con FEV₁>80% anche se questi dati non sono statisticamente rilevanti (p>0.05). Lo stesso vale anche per il confronto tra soggetti con bronchite cronica e i soggetti senza bronchite cronica dove vi è una differenza di espressione. Questa risulta maggiore nei soggetti

senza bronchite cronica, tuttavia la differenza non è statisticamente significativa ($p>0.05$) (Figura 10).

Anche il confronto tra quei soggetti che presentano contemporaneamente sia la bronchite cronica che un $FEV_1<80\%$ e tutti gli altri BPCO evidenzia una riduzione dei livelli di espressione nei soggetti con bronchite cronica e FEV_1 ridotto senza però che anche in questo caso si possa avere rilevanza statistica ($p>0.05$) (Figura 11).

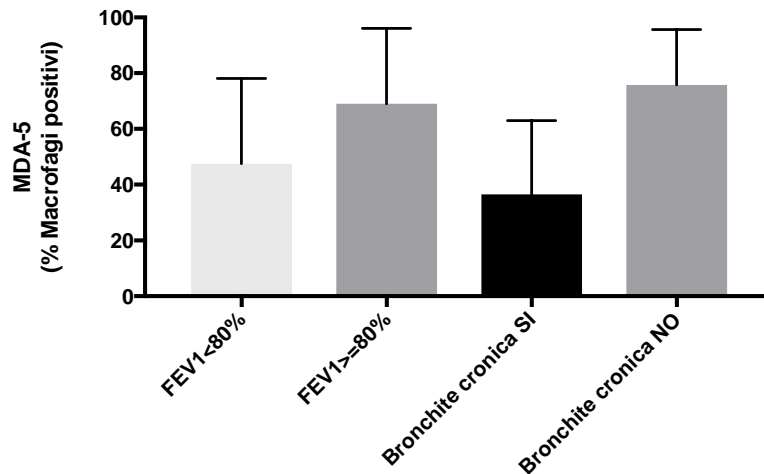


Fig.10 Livelli di espressione di MDA5. Ogni barra indica i livelli di espressione di MDA5 riscontrato nei macrofagi dei pazienti con BPCO, evidenziando livelli di espressione di MDA5 diversi a seconda del sottogruppo.

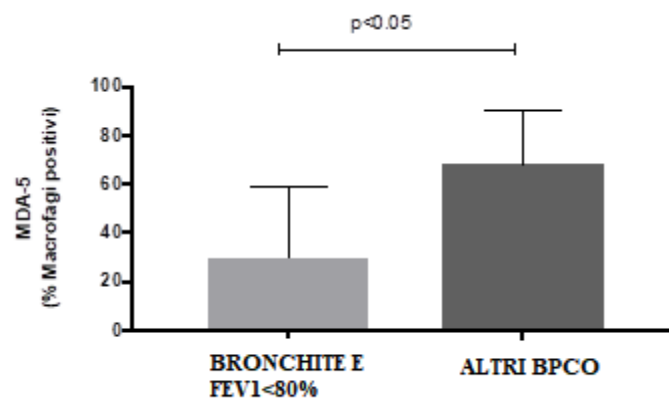


Fig.11 Livelli di espressione del recettore citoplasmatico MDA5. Le due barre indicano i livelli di espressione di MDA5 riscontrato nei macrofagi dei pazienti con BPCO. I livelli di espressione del recettore nei pazienti con BPCO ostruiti e con bronchite cronica sono ridotti rispetto agli altri BPCO.

Confronto dei risultati ottenuti

Confrontando i risultati ottenuti per le diverse molecole analizzate è possibile osservarne lo stesso andamento di espressione nei gruppi oggetti di studio. Il fumo di sigaretta sembra infatti aumentare i livelli di espressione di IRF3 ed MDA5, nonché il numero di cellule NK (significativamente per IRF3 ed NKp46). Con l'affermarsi della patologia vi è un ulteriore aumento dei livelli di espressione (Figura 12).

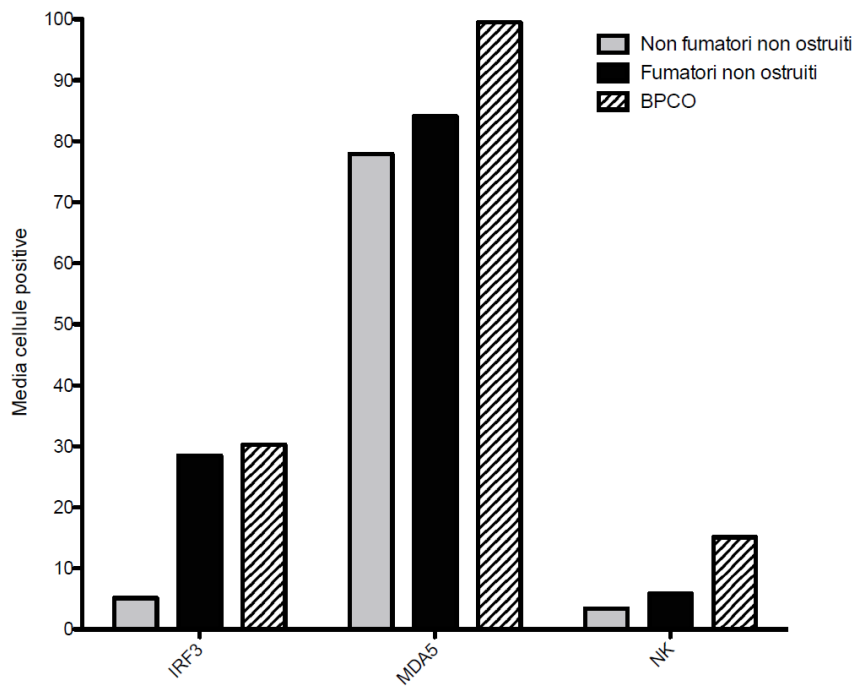


Fig.12 Il grafico riporta l'andamento delle medie dei valori di espressione delle molecole analizzate in ciascun gruppo.

DISCUSSIONE

La Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) è un'inflammatione cronica delle vie aeree e del tessuto polmonare che, in maniera lenta e progressiva, provoca l'ostruzione dei bronchi e la conseguente limitazione del flusso aereo. Il processo infiammatorio cronico alla base della patologia coinvolge sia l'immunità innata che adattativa, con effetti maggiormente evidenti a livello delle pareti bronchiali delle piccole vie aeree.

Una volta instaurato il processo infiammatorio nella BPCO questo persiste nonostante la cessazione dell'insulto (più frequentemente il fumo di sigaretta) e progredisce nel tempo. Hogg e collaboratori mostrano come l'interruzione del fumo non sia sufficiente per la regressione della malattia, ma vi è una progressiva ostruzione delle piccole vie aeree, anche diversi anni dopo aver smesso di fumare [89]. L'ostruzione del flusso d'aria è riconducibile all'accumulo di essudato infiammatorio mucoso nel lume delle piccole vie aeree e all'ispessimento della parete bronchiale, caratterizzato da infiltrato cellulare immunitario che ha dato origine a follicoli linfoidi.

Questo studio si pone l'obiettivo di individuare alterazioni dell'immunità innata nei pazienti sani fumatori e con BPCO per capirne il ruolo nell'insorgenza e nella progressione della malattia. La letteratura degli ultimi decenni dimostra che la risposta immunologica sia in qualche modo alterata nei soggetti esposti al fumo di sigaretta, promuovendo l'inflammatione cronica alla base della patologia. Partendo dalle biopsie di tessuto polmonare ottenute da pazienti con BPCO, soggetti fumatori non ostruiti e soggetti controllo non fumatori non ostruiti, è stata analizzata, attraverso analisi immunoistochimica, l'espressione di cellule NK, principale componente cellulare dell'immunità innata con attività citotossica, e di due molecole coinvolte nella cascata innescata dagli interferoni, essenziali per un'adeguata risposta antimicrobica: il fattore di trascrizione IRF3 e il recettore citoplasmatico MDA-5.

Alcuni studi recenti suggeriscono un ruolo importante delle NK nella progressione della malattia, riconducibile ad una aumentata attività citotossica in grado di provocare danno tissutale e favorire il processo di flogosi nelle vie aeree. Sebbene il numero di cellule NK nel sangue periferico, nel BALF e nel parenchima polmonare di pazienti con BPCO risulti essere invariato rispetto ai fumatori senza BPCO [76, 77], è stato riscontrato un aumento significativo delle cellule NK CD57⁺ citotossiche nei follicoli linfoidi polmonari di pazienti

con BPCO rispetto ai fumatori senza BPCO [78]. Le cellule NK mostrano anche una iperresponsività nella BPCO, come emerso dallo studio condotto da Freeman e collaboratori, in cui le cellule NK CD56⁺ CD16⁺ uccidono le cellule parenchimali polmonari autologhe, in particolare le cellule epiteliali CD326⁺, favorendo lo sviluppo di enfisema polmonare [79].

Tuttavia sussistono evidenze contrastanti secondo cui il fumo di sigaretta diminuisce [70, 71], aumenta [72] o non ha alcun effetto [73] sull'attività citotossica delle NK. Ad esempio, dallo studio condotto da Mian [74] e collaboratori emerge una ridotta attività delle cellule NK isolate da sangue periferico di pazienti fumatori, che hanno una minore capacità di produrre IFN- γ e TNF- α in risposta a citochine, una ridotta espressione di perforina ed una ridotta attività citotossica rispetto alle NK isolate dal sangue periferico di pazienti non fumatori. È doveroso dunque considerare il contesto tissutale, la finestra temporale e il grado di insulto alla base delle alterazioni delle cellule NK. È stato inoltre dimostrata [80] un'aumentata presenza di cellule NK nel BALF ottenuto da pazienti con BPCO rispetto a quello ottenuto da fumatori e da non fumatori sani. È interessante notare che il numero di cellule NK non si normalizza nel tempo nei soggetti con BPCO che smettono di fumare, così come la sintomatologia non tende a risolversi.

Analizzando i risultati ottenuti in questo studio, è possibile osservare un aumento significativo del numero di cellule NK NKp46⁺ citotossiche presenti a livello del parenchima polmonare dei pazienti con BPCO. Il numero di NK tende ad aumentare anche nei pazienti fumatori non ostruiti rispetto ai non fumatori non ostruiti (Figura 5). Considerando inoltre che, ad aggravare il quadro clinico dei pazienti con BPCO, favorendo la progressione della malattia, sono spesso le riacutizzazioni di origine infettiva [102-104], queste evidenze potrebbero essere correlate ad una possibile disfunzione della barriera epiteliale, soggetta ad un'ambiente fortemente ossidativo tipico della flogosi, all'insulto diretto del fumo, e all'aumentato numero di cellule NK locali attivate. I pazienti con esacerbazioni frequenti rappresentano un sottogruppo di BPCO che richiede migliori opzioni terapeutiche. Recentemente c'è stato un crescente interesse per questo sottogruppo di pazienti suscettibili ad esacerbazioni, definiti come fenotipo "esacerbatore frequente", per gli esiti clinici peggiori tra cui aumento della morbilità, accelerato declino della funzionalità polmonare e maggiore mortalità. Ad oggi, il meccanismi sottostanti che predispongono tali pazienti a esacerbazioni più frequenti non sono stati ancora ben definiti.

I virus sono un importante fattore eziologico di esacerbazioni [105, 106] ed esistono dati che suggeriscono che la BPCO potrebbe essere associata anche ad una deficienza immunitaria anti-virale [30, 107]. Secondo uno studio molto recente [108], le cellule ottenute dall'espettorato di pazienti esacerbatori frequenti mostrerebbero un'espressione ridotta dell'mRNA degli interferoni di tipo I e III, così come una ridotta espressione del gene stimolato dagli interferoni (ISG) sia quando clinicamente stabili, sia durante l'esacerbazione associata a virus. Questi pazienti mostrano inoltre un aumento della carica batterica nell'espettorato a 2 settimane dopo l'insorgenza dell'esacerbazione associata a virus.

Anche alcune molecole chiave della cascata degli interferoni risultano meno espresse in pazienti con BPCO, come evidenzia lo studio condotto da Garcia-Valero e collaboratori [109], che dimostrano una ridotta espressione costitutiva di IFN- β , IRF-7, RIG-I e MDA-5 nella maggior parte delle cellule polmonari, suggerendo una correlazione tra la compromissione della risposta immunologica innata e le esacerbazioni virali acute che accompagnano la storia naturale di questi pazienti.

È sicuramente importante considerare anche i fattori genetici di questi pazienti e l'epigenetica associata al fumo di sigaretta. Hudy e collaboratori [110] hanno concentrato il loro studio sul meccanismo d'azione degli estratti del fumo di sigaretta osservando come questi siano in grado di determinare delle modificazioni epigenetiche che vanno a silenziare un'ampia gamma di molecole antivirali solitamente espresse in seguito all'esposizione a Rhinovirus (HRV). Tra questi in particolare risulta essere inibita a livello di trascrizione in seguito all'esposizione al fumo di sigaretta il CXCL10, una chemochina correlata alla risposta antivirale in grado di reclutare linfociti T e cellule Natural Killer nel sito dell'infezione.

I composti del fumo sono in grado anche di ridurre l'azione dell'IFN- γ grazie all'effetto dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) nei confronti di STAT. Impedendo la fosforilazione di STAT non è possibile ottenere la traslocazione nucleare del complesso dimerico e questo determina una riduzione dell'espressione di quei geni implicati nella risposta all'infezione virale [111].

Gli studi che hanno concentrato la loro attenzione sulla risposta immunologica innata di pazienti con BPCO sembrano concordi nel documentare, nel modello umano, una risposta immunologica innata alterata, deficitaria in alcune sue componenti, iper-responsiva nel caso di altre.

I nostri risultati sui livelli di espressione di IRF3 e MDA5 sembrano essere apparentemente discordanti con la letteratura presente, in quanto l'esposizione al fumo di sigaretta sembrerebbe attivare temporaneamente la risposta immunologica innata come testimoniato dagli elevati livelli di IRF3 e MDA5 nei soggetti con BPCO fumatori rispetto ai gruppi dei non fumatori non ostruiti e dei fumatori non ostruiti (Figura 12). Tuttavia, andando a stratificare maggiormente la popolazione, è possibile osservare che nei soggetti con un quadro clinico più grave vi è una netta riduzione di IRF3 e MDA5 (Figura 7 e 10). Questi risultati ci portano ad ipotizzare che vi sia una finestra nella storia naturale della malattia dove assistiamo ad una risposta immunologica precocissima, attivata in seguito all'esposizione al fumo di sigaretta, che sembra essere differente rispetto a quella descritta fino ad ora. L'azione del fumo di sigaretta è certamente lesiva per il nostro organismo ed è quindi possibile che vi sia una iniziale attivazione aspecifica della risposta immunitaria, evidenziata dai livelli elevati dei marcatori studiati. Quando questa attivazione viene a mancare si assiste ad un peggioramento del quadro clinico e ad una progressione della malattia. Sarebbe molto interessante capire quali sono i meccanismi che, attivandosi in alcuni soggetti, portano ad un crollo della risposta immunologica innata e ad una conseguente progressione della malattia.

CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo studio è stato quello di indagare alcuni meccanismi della risposta innata nella patogenesi della BPCO, nonché nel fenotipo che essa assume.

Attraverso analisi immunohistochemica su parenchima polmonare di soggetti con BPCO da esposizione al fumo, di soggetti fumatori non ostruiti, e di soggetti controllo non fumatori e non ostruiti, è stata valutata, per la prima volta, l'espressione di cellule NK NKp46⁺, principale componente cellulare dell'immunità innata con attività citotossica, e di due molecole coinvolte nella cascata innescata dagli interferoni, essenziali per un'adeguata risposta antimicrobica: il fattore di trascrizione IRF3 e il recettore citoplasmatico MDA-5.

I risultati dimostrano, nel gruppo dei soggetti con BPCO, un'aumentata presenza di cellule NK e livelli di espressione di IRF3 e MDA5 superiori rispetto agli altri due gruppi (fumatori ostruiti e non ostruiti). Valutando inoltre i valori di queste molecole nel gruppo dei soggetti con BPCO, suddivisi sulla base del fenotipo della patologia descritto dalle variabili FEV₁<80% e presenza di bronchite cronica, emerge che i pazienti con BPCO ostruiti e con bronchite cronica hanno dei valori ridotti di IRF3 e MDA5.

L'esagerata o l'attenuazione della risposta immunitaria innata, in seguito all'esposizione al fumo e ad agenti infettivi, può innescare o perpetuare un meccanismo patogenetico e rendere ragione della differente espressione clinica della malattia. Questi risultati fanno ipotizzare che la risposta immunitaria innata subisca una modulazione nel corso della storia naturale della malattia. In un primo momento l'esposizione ad uno stimolo nocivo, come il fumo di sigaretta, sembra attivare una risposta immunitaria aspecifica, evento al quale fa poi seguito una disfunzione immunitaria con relativo peggioramento delle condizioni cliniche del paziente.

I meccanismi alla base di questa diversa espressione immunitaria nel corso della malattia non sono ancora noti ma sarebbe molto interessante in futuro approfondire l'argomento per capire se vi è un esaurimento della risposta immunitaria innata o un silenziamento genico indotto dal fumo di sigaretta stesso.

BIBLIOGRAFIA

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380(9859): 2095-128.
2. Lopez, A.D.; Shibuya, K.; Rao, C.; Mathers, C.D.; Hansell, A.L.; Held, L.S.; Schmid, V.; Buist, S. Chronic obstructive pulmonary disease: Current burden and future projections. *Eur. Respir. J.* 2006, 27, 397–412.
3. World Health Organization. World Health Organization Report: Burden of Chronic Respiratory Disease; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2011.
4. Linee guida Gold
5. Lange P, Celli B, Agusti A, et al. Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2015; 373(2): 111-22.
6. Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Guerra S, Martinez FD. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet* 2007; 370(9589):758-64.
7. Tashkin DP, Altose MD, Bleeker ER, et al. The lung health study: airway responsiveness to inhaled methacholine in smokers with mild to moderate airflow limitation. The Lung Health Study Research Group. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145(2 Pt 1): 301-10.
8. Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agusti A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180(1): 3-10.
9. Raad D, Gaddam S, Schunemann HJ, et al. Effects of water-pipe smoking on lung function: a systematic review and meta-analysis. *Chest* 2011; 139(4): 764-74.
10. She J, Yang P, Wang Y, et al. Chinese water-pipe smoking and the risk of COPD. *Chest* 2014; 146(4): 924-31.
11. Gunen H, Tarraf H, Nemati A, Al Ghobain M, Al Mutairi S, Aoun Bacah Z. Waterpipe tobacco smoking. *Tuberk Toraks* 2016; 64(1): 94-6.
12. Tan WC, Lo C, Jong A, et al. Marijuana and chronic obstructive lung disease: a population-based study. *CMAJ* 2009; 180(8): 814-20.
13. Yin P, Jiang CQ, Cheng KK, et al. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study. *Lancet* 2007; 370(9589): 751- 7.
14. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, et al. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(5): 693-718.
15. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet* 2009; 374(9691): 733-43.
16. Paulin LM, Diette GB, Blanc PD, et al. Occupational exposures are associated with worse morbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(5): 557-65.
17. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005; 365(9478): 2225-36.

18. Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, et al. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med* 2009; 361: 2599-608.
19. Ding Z, Wang K, Li J, Tan Q, Tan W, Guo G. Association between glutathione S-transferase gene M1 and T1 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease risk: A meta-analysis. *Clinical genetics* 2018.
20. Cho SH, Lin HC, Ghoshal AG, et al. Respiratory disease in the Asia-Pacific region: Cough as a key symptom. *Allergy Asthma Proc* 2016; 37(2):131-40.
21. von Haehling S, Anker SD. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 2010; 1(1): 1-5.
22. Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(5): 1151-6.
23. Rutten EP, Calverley PM, Casaburi R, et al. Changes in body composition in patients with chronic obstructive pulmonary disease: do they influence patient-related outcomes? *Annals of nutrition & metabolism* 2013; 63(3): 239-47.
24. Schols AM, Broekhuizen R, Welting-Scheepers CA, Wouters EF. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr* 2005; 82(1): 53-9.
25. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370(9589): 741-50.
26. Jackson H, Hubbard R. Detecting chronic obstructive pulmonary disease using peak flow rate: cross sectional survey. *BMJ* 2003; 327(7416): 653-4.
27. WHO meeting participants. Alpha 1-antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1997; 75(5): 397-415.
28. Jones PW. Health status and the spiral of decline. *COPD* 2009; 6(1): 59-63.
29. Han MK, Muellerova H, Curran-Everett D, et al. GOLD 2011 disease severity classification in COPD Gene: a prospective cohort study. *The Lancet Respiratory medicine* 2013; 1(1): 43-50.
30. Mallia P, Message SD, Gielen V, Contoli M, Gray K, Kebabdz T, et al. Experimental rhinovirus infection as a human model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6):734-42.
31. Hogg JC. Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10 Pt 2):S71-5.
32. Wei J, Ma Y, Wang L, Chi X, Yan R, Wang S, Li X, Chen X, Shao W, Chen JL. Alpha/beta interferon receptor deficiency in mice significantly enhances susceptibility of the animals to pseudorabies virus infection. *Vet Microbiol*. 2017 May;203:234-244. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.03.022.
33. Utokaparch S, Sze MA, Gosselink JV, McDonough JE, Elliott WM, Hogg JC, et al. Respiratory viral detection and small airway inflammation in lung tissue of patients with stable, mild COPD. *COPD*. 2014;11(2):197-203.
34. Matsumoto K, Inoue H. Viral infections in asthma and COPD. *Respir Investig*. 2014;52(2):92-100.
35. Shaykhiiev R, Otaki F, Bonsu P, Dang DT, Teater M, Strulovici-Barel Y, Salit J, Harvey BG, Crystal RG. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex

- molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:877–892
36. Auerbach O, Forman JB, Gere JB, Kassouny DY, Muehsam GE, Petrick TG, Smolin HJ, Stout AP. Changes in the bronchial epithelium in relation to smoking and cancer of the lung; a report of progress. *N Engl J Med*. 1957;256:97–104.
 37. Leopold PL, O'Mahony MJ, Lian XJ, Tilley AE, Harvey BG, Crystal RG. Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS One*. 2009;4:e8157
 38. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax*. 1984;39:844–849.
 39. Manzel LJ, Shi L, O'Shaughnessy PT, Thorne PS, Look DC. Inhibition by cigarette smoke of nuclear factor-kappaB-dependent response to bacteria in the airway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44:155–165.
 40. Sajjan US. Susceptibility to viral infections in chronic obstructive pulmonary disease: role of epithelial cells. *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19:125–132
 41. Kennedy SM, Elwood RK, Wiggs BJ, Pare PD, Hogg JC. Increased airway mucosal permeability of smokers. Relationship to airway reactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1984;129:143–148.
 42. Heijink IH, Brandenburg SM, Postma DS, van Oosterhout AJ. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur Respir J*. 2012;39:419–428.
 43. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, Crystal RG. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2009;183:2867–2883
 44. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD*. 2004;1:59–70.
 45. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CM, Tudhope SJ, Wedzicha JA, Barnes PJ, Donnelly LE. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J*. 2010;35:1039–1047.
 46. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Demedts IK, De RK, Reinartz SM, van Drunen CM, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. *Respir Res*. 2010;11:35
 47. Tsoumakidou M, Koutsopoulos AV, Tzanakis N, Dambaki K, Tzortzaki E, Zakynthinos S, Jeffery PK, Siafakas NM. Decreased small airway and alveolar CD83+ dendritic cells in COPD. *Chest*. 2009;136:726–733
 48. Rogers AV, Adelroth E, Hattotuwa K, Dewar A, Jeffery PK. Bronchial mucosal dendritic cells in smokers and ex-smokers with COPD: an electron microscopic study. *Thorax*. 2008;63:108–114
 49. Robbins CS, Dawe DE, Goncharova SI, Pouladi MA, Drannik AG, Swirski FK, Cox G, Stampfli MR. Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30:202–211
 50. Hoenderdos K, Condliffe A. The Neutrophil in COPD: Too Little Too Late, or Too Much Too Soon? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013
 51. Yoshikawa T, Dent G, Ward J, Angco G, Nong G, Nomura N, Hirata K, Djukanovic R. Impaired neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:473–479

52. Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord JM, Insall RH, Stockley RA. Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:1176–1186
53. Zappacosta B, Persichilli S, Minucci A, Fasanella S, Scribano D, Giardina B, De SP. Effect of cigarette smoke extract on the polymorphonuclear leukocytes chemiluminescence: influence of a filter containing glutathione. *Luminescence.* 2005;20:73–75
54. Joanna Mikulak, Elena Bruni, Ferdinando Oriolo, Clara Di Vito and Domenico Mavilio. Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. *Front. Immunol.*, 30 April 2019
55. Dorothy K. Sojka, Liping Yang, and Wayne M. Yokoyama. Uterine Natural Killer Cells. Special Issue: The Effect of the Maternal Environment December 1, 2018 Volume 10, Issue 20, Pages 1531-1538.
56. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev.* 2006;214:73–91.
57. Kerry S Campbell and Amanda K Purdy, Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology.* 2011 Mar; 132(3): 315–325.
58. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, Biassoni R, Moretta A. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med.* 1998 Sep 7; 188(5):953-60.
59. Westgaard IH, Berg SF, Vaage JT, Wang LL, Yokoyama WM, Dissen E, Fossum S. J Leukoc. Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcepsilonRIgamma and CD3zeta. *Biol.* 2004 Dec; 76(6):1200-6.
60. Kelly Hudspeth, Bruno Silva-Santos, Domenico Mavilio. Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells. *Frontiers in Immunology* 4(69):69 · March 2013
61. Sivori S Pende D Bottino C et al..NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells: correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol.* 1999;29:1656–1666.
62. Sivori S Vitale M Morelli L et al. . p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med .* 1997;186:1129–1136
63. Halfteck GG Elboim M Gur C et al.. Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J Immunol.* 2009;182:2221–2230.
64. Mandelboim O Lieberman N Lev M et al.. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.* 2001;409:1055–1060
65. Shirin Elhaik-Goldman, Daniel Kafka, Rami Yossef, et al.. The Natural Cytotoxicity Receptor 1 Contribution to Early Clearance of *Streptococcus pneumoniae* and to Natural Killer-Macrophage Cross Talk. *PLoS One.* 2011; 6(8): e23472. Published online 2011 Aug 22. doi: 10.1371/journal.pone.0023472

66. Carretero M, Cantoni C, Bellón T, Bottino C, Biassoni R, Rodríguez A, Pérez-Villar J, Moretta L, Moretta A, López-Botet M. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol.* 1997;27:563–567.
67. Colonna M, Navarro F, Bellón T, Llano M, García P, Samaridis J, Angman L, Cella M, López-Botet M. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med.* 1997;186:1809–1817.
68. Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew H. (2009), *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* (3 ed.), Philadelphia, PA: Saunders, ISBN 978-1-4160-4688-2
69. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA . The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633–640.
70. Takeuchi, M., Nagai, S., Izumi, T. (1988) Effect of smoking on natural killer cell activity in the lung. *Chest* 94, 688– 693.
71. Meliska, C. J., Stunkard, M. E., Gilbert, D. G., Jensen, R. A., Martinko, J. M. (1995) Immune function in cigarette smokers who quit smoking for 31 days. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95, 901– 910.
72. Newman, L. S., Kreiss, K., Campbell, P. A. (1991) Natural killer cell tumoricidal activity in cigarette smokers and in silicotics. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 60, 399– 411.
73. Phillips, B., Marshall, M. E., Brown, S., Thompson, J. S. (1985) Effect of smoking on human natural killer cell activity. *Cancer* 56, 2789– 2792.
74. Mian MF, Lauzon NM, Stampfli MR, Mossman KL, Ashkar AA. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *J Leukoc Biol.* 2008;83:774–784.
75. Eriksson Ström J, Pourazar J, Linder R, Blomberg A, Lindberg A, Bucht A, Behndig A. Cytotoxic lymphocytes in COPD airways: increased NK cells associated with disease, iNKT and NKT-like cells with current smoking. *Respir Res.* 2018 Dec 7;19(1):244. doi: 10.1186/s12931-018-0940-7.
76. Freeman CM, Stolberg VR, Crudgington S, Martinez FJ, Han MK et al.. Human CD56+ cytotoxic lung lymphocytes kill autologous lung cells in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE.* (2014) 9:e103840. 10.1371/journal.pone.0103840
77. Hodge G, Mukaro V, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Enhanced cytotoxic function of natural killer and natural killer T-like cells associated with decreased CD94 (Kp43) in the chronic obstructive pulmonary disease airway. *Respirology.* (2013) 18:369–76. 10.1111/j.1440-1843.2012.02287.
78. Olloquequi J, Montes JF, Prats A, Rodriguez E, Montero MA, Garcia-Valero J, et al. . Significant increase of CD57+ cells in pulmonary lymphoid follicles of COPD patients. *Eur Respir J.* (2011) 37:289–98. 10.1183/09031936.00201509
79. Christine M. Freeman, Valerie R. Stolberg, Sean Crudgington et al.. Human CD56+ Cytotoxic Lung Lymphocytes Kill Autologous Lung Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One.* 2014; 9(7): e103840.

80. Hodge, M. Holmes, H. Jersmann et al., “The drug efflux pump Pgp1 in pro-inflammatory lymphocytes is a target for novel treatment strategies in COPD,” *Respiratory Research*, vol. 14, article 63, 2013.
81. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378:1015–1026
82. Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4:512–521
83. Huttunen R, Heikkinen T, Syrjänen J. Smoking and the outcome of infection. *J Intern Med* 2011;269:258-69. 10.1111/j.1365-2796.2010.02332.
84. Sethi S. Infection as a comorbidity of COPD. *Eur Respir J* 2010;35:1209-15. 10.1183/09031936.00081409
85. Geng Y, Savage SM, Razani-Boroujerdi S, Sopori ML. Effects of nicotine on the immune response. II. Chronic nicotine treatment induces T cell anergy. *J Immunol*. 1996;156:2384–2390.
86. Robbins CS, Bauer CM, Vujicic N, Gaschler GJ, Lichty BD, Brown EG, Stampfli MR. Cigarette smoke impacts immune inflammatory responses to influenza in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:1342–1351
87. M. G. Cosio, M. Saetta, and A. Agusti, “Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 23, pp. 2396–2454, 2009.
88. M. Saetta, A. di Stefano, G. Turato et al., “CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease,” *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 157, no. 3, pp. 822–826, 1998.
89. J. C. Hogg, F. Chu, S. Utokaparch et al., “The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 26, pp. 2645–2653, 2004.
90. A. Prokhou, N. Soultzis, E. Neofytou et al., “Granule cytotoxic activity and oxidative DNA damage in smoking and non-smoking asthmatics,” *Chest*, 2013.
91. W. D. Kim, H. S. Chi, K. H. Choe et al., “A possible role for CD8+ and non-CD8+ cell granzyme B in early small airway wall remodelling in centrilobular emphysema,” *Respirology*, vol. 18, no. 4, pp. 688–696, 2013.
92. R. A. Urbanowicz, J. R. Lamb, I. Todd, J. M. Corne, and L. C. Fairclough, “Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients,” *Respiratory Research*, vol. 11, article 76, 2010.
93. A. di Stefano, G. Caramori, I. Gnemmi et al., “T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 157, no. 2, pp. 316–324, 2009.
94. S. Grumelli, D. B. Corry, L.-Z. Song et al., “An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema,” *PLoS Medicine*, vol. 1, no. 1, article e8, 2004.
95. Q. Tang and J. A. Bluestone, “The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation,” *Nature Immunology*, vol. 9, no. 3, pp. 239–244, 2008.
96. Gosman MM, Willemse BW, Jansen DF, Lapperre TS, van Schadewijk A, Hiemstra PS, Postma DS, Timens W, Kerstjens HA.; Groningen and Leiden Universities

- Corticosteroids in Obstructive Lung Disease Study Group. Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 27: 60–64, 2006.
97. Brandsma CA, Hylkema MN, Geerlings M, van Geffen WH, Postma DS, Timens W, Kerstjens HA. Increased levels of (class switched) memory B cells in peripheral blood of current smokers. *Respir Res* 10: 108, 2009.
 98. Zhu J, Qiu Y, Valobra M, Qiu S, Majumdar S, Matin D, De R, V, Jeffery PK. Plasma cells and IL-4 in chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 1125–1133, 2007.
 99. Gohy ST, Detry BR, Lecocq M, Bouzin C, Weynand BA, Amatngalim GD, Sibille YM, Pilette C. Polymeric immunoglobulin receptor down-regulation in chronic obstructive pulmonary disease. Persistence in the cultured epithelium and role of transforming growth factor-beta. *Am J Respir Crit Care Med* 190: 509–521, 2014.
 100. Polosukhin VV, Cates JM, Lawson WE, Zaynagetdinov R, Milstone AP, Massion PP, Ocak S, Ware LB, Lee JW, Bowler RP, Kononov AV, Randell SH, Blackwell TS. Bronchial secretory immunoglobulin a deficiency correlates with airway inflammation and progression of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 317–327, 2011.
 101. Richmond BW, Brucker RM, Han W, Du RH, Zhang Y, Cheng DS, Gleaves L, Abdolrasulnia R, Polosukhina D, Clark PE, Bordenstein SR, Blackwell TS, Polosukhin VV. Airway bacteria drive a progressive COPD-like phenotype in mice with polymeric immunoglobulin receptor deficiency. *Nat Commun* 7: 11240, 2016
 102. Celli BR, Barnes PJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* (2007) 29:1224–38.
 103. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* (2008) 359:2355–65.
 104. Marin A, Monso E, Garcia-Nunez M, Sauleda J, Noguera A, Pons J, et al. . Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur Respir J.* (2010) 35:295–302.
 105. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2001;164(9):1618-1623. 7.
 106. Rohde G, Wiethage A, Borg I, et al. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax.* 2003;58(1):37-42.
 107. Hsu AC, Parsons K, Moheimani F, et al. Impaired Antiviral Stress Granule and IFN-beta Enhanceosome Formation Enhances Susceptibility to Influenza Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2016;55(1):117-127.
 108. Singanayagam, A. et al. Anti-viral immunity is impaired in COPD patients with frequent exacerbations. 2019. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 190, 145.
 109. García-Valero, J. et al. Deficient pulmonary IFN- β expression in COPD patients. *PLoS ONE* 14, e0217803 (2019).
 110. Hudy MH, Traves SL, Wiehler S, Proud D. Cigarette smoke modulates rhinovirus-induced airway epithelial cell chemokine production. *Eur Respir J* 2010;35:1256–1263.

111. Modestos a Modestou, Lori J. Manzel et al. Inhibition of IFN- γ -dependent antiviral airway epithelial defense by cigarette smoke. *Respir Res* 2010.