

Articolo di revisione / Review article

Microbiota e risposta infiammatoria nella broncopneumopatia cronica ostruttiva

Microbiota and inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease

Dario Saguto¹, Francesco Cappello¹, Mariasofia Accardo², Marco Mosella², Silvestro Ennio D'Anna²

¹ Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica avanzata (BIND), Università degli Studi di Palermo, Palermo; ² Divisione di Pneumologia, Istituti Clinici Scientifici Maugeri, IRCCS, Telese (BN)

Riassunto

Nei pazienti con BPCO, le infezioni batteriche e virali rivestono un ruolo rilevante nel peggioramento della funzione polmonare favorendo la progressione della malattia.

La risposta infiammatoria contro le infezioni batteriche e virali delle basse vie aeree può essere un indicatore specifico di progressione di malattia.

Il controllo della risposta infiammatoria polmonare, in patologie croniche come la BPCO, potrebbe ridurre il rischio di declino della funzione polmonare.

Scopo del nostro lavoro è la revisione dei dati sull'interazione tra il microbiota e l'ospite e sulla alterazione della risposta immunitaria nella BPCO stabile ed esacerbata.

Saranno esaminate le vie molecolari prevalenti in queste diverse condizioni cliniche.

Sarà discusso anche il ruolo dei macrofagi, dell'autofagia e della NETosi nel contesto delle infezioni polmonari in pazienti affetti da BPCO.

Parole chiave: microbiota, BPCO, infezioni, infiammazione

Summary

Viral and bacterial infections play a crucial role in the worsening of the pulmonary functioning on chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) patients, thus favoring the progression of the disease. Inflammatory response against lower airways' viral and bacterial infections could be a specific marker of the progression of the disease.

The control of the pulmonary inflammatory response in chronic diseases like COPD could reduce the risk of pulmonary function decline.

Aim of this paper is to revise the data about microbiota/host interaction and the alteration of the immune response in stable and exacerbated COPD. The molecular patterns prevalent in these different clinical conditions will be examined as well as the role of the macrophages, of the autophagy and of the NETosis during lung infections in COPD patients.

Key words: microbiota, COPD, infections, inflammation

Introduzione

L'apparato respiratorio umano di soggetti sani è popolato da diverse specie di batteri e virus che hanno, nella maggior parte dei casi, una relazione simbiotica con l'ospite. Pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) hanno un microbiota delle vie aeree diverso rispetto ai soggetti sani e mostrano maggiore infiammazione bronchiale che determina progressione di malattia^{1,2}.

Il microbiota, in pazienti con BPCO, varia la sua composizione durante le riacutizzazioni e si modifica con l'avanzare della malattia. Alterazioni nelle

Ricevuto il 8-7-2021
Accettato il 15-9-2021

Corrispondenza

Silvestro Ennio D'Anna
Divisione di Pneumologia Riabilitativa, Istituti Clinici Scientifici Maugeri, IRCCS, via Bagni Vecchi 1, 82037 Telese (BN)
silvestro.danna@icsmaugeri.it

Conflitto di interessi

Gli autori dichiarano di non avere nessun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.

Come citare questo articolo: Saguto D, Cappello F, Accardo M, et al. Microbiota e risposta infiammatoria nella broncopneumopatia cronica ostruttiva. Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio 2022;37:86-94. <https://doi.org/10.36166/2531-4920-562>

© Copyright by Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri – Italian Thoracic Society (AIPO – ITS)



OPEN ACCESS

L'articolo è open access e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

cellule del sistema immunitario in pazienti BPCO possono determinare una differente patogenicità di virus e batteri ³. La loro interazione con il sistema respiratorio dei pazienti BPCO è una delle maggiori cause di esacerbazione e potrebbe aumentarne l'infiammazione bronchiale ⁴.

La colonizzazione/infezione di microorganismi nelle vie aeree, associata a stress ossidativo e a processi infiammatori, causa il peggioramento progressivo dei flussi delle vie aeree e delle manifestazioni di malattia ⁵.

In questa review discuteremo dei dati sull'interazione tra il microbioma e l'ospite e sull'alterazione della risposta immunitaria nella BPCO stabile e durante esacerbazione.

Batteri e virus in BPCO

Batteri in BPCO stabile

L'utilizzo di metodi non colturali, come la reazione a catena quantitativa della polimerasi (qPCR), ha evidenziato come i polmoni di individui sani siano colonizzati da popolazioni di batteri ⁶ differenti rispetto ai broncopatici cronici ⁷.

Le specie isolate nelle basse vie aeree di pazienti BPCO sono prevalentemente *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e, nei più gravi, *Pseudomonas aeruginosa* ^{8,9}.

È stata riportata una correlazione positiva tra il carico batterico nelle vie aeree e l'infiammazione bronchiale ¹⁰. Il numero di *M. catarrhalis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* risulta correlato al grado di infiammazione bronchiale ¹¹. Barker et al. hanno dimostrato che la presenza di batteri nelle vie aeree di pazienti BPCO stabili, correla positivamente con IL-1b, IL-10 and *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α) e negativamente con CCL13 ¹². Batteri come *Haemophilus* e *Moraxella* possono stimolare 3-5 volte in più la secrezione di IL-10, IL-12p70 e IL-23 in cellule dendritiche rispetto ad altri batteri commensali gram positivi come gli *Actinomiceti* ¹³. Specie di *Prevotella* riescono a ridurre del 50% la secrezione di IL-12p70 indotta da *Haemophilus* in cellule dendritiche ¹³. Alcuni gram negativi e i loro lipopolisaccaridi inducono la produzione di specifiche citochine che stimolano componenti del sistema immunitario innato e la risposta infiammatoria mediata dai Toll-like receptor 4 (TLR4) ¹³.

Erb-Downward et al. hanno evidenziato in campioni ottenuti da lavaggio broncoalveolare di pazienti affetti da BPCO una riduzione della varietà del microbiota rispetto a individui sani ¹⁴. La riduzione della varietà batterica è stata osservata nell'espettorato di pazienti BPCO stabili con una malattia più grave. Si è ipotizzato quindi che, con il progredire della malattia, vi sia una sostituzione

della normale flora con specie batteriche normalmente poco rappresentate in pazienti con malattia meno severa ¹⁵. Questa alterazione del microbiota potrebbe indurre ulteriore infiammazione polmonare e peggiorare la malattia ¹⁵. È stato riportato in pazienti BPCO gravi un aumento relativo di proteobatteri e actinobatteri associato a una riduzione del phylum dei Firmicutes ¹⁶.

L'alterazione del microbiota è correlata con una maggior estensione di enfisema e di infiltrazione di cellule immunitarie nel polmone ^{16,17}. Differenze nella composizione del microbiota sono state osservate in pazienti con quadro TAC di enfisema polmonare o di ispessimento delle pareti bronchiali da bronchite cronica rispetto a pazienti senza alterazioni TAC del parenchima polmonare ¹⁸.

Un'approfondita conoscenza del microbiota polmonare risulterebbe utile nel comprendere la relazione tra microbiota e fenotipi clinici della BPCO.

Batteri isolati nella fase di riacutizzazione di BPCO

Le esacerbazioni in pazienti BPCO sono associate a cambiamenti dell'infiammazione delle vie aeree e della composizione del microbiota. Una metanalisi ha isolato batteri in circa il 50% delle esacerbazioni in pazienti BPCO ¹⁹. L'isolamento di nuovi ceppi di *H. influenzae*, *M. catarrhalis* o *S. pneumoniae* nell'espettorato di pazienti BPCO è correlato a un'aumentata possibilità di esacerbazione ²⁰. I Pazienti soggetti a frequenti esacerbazioni hanno un'alta probabilità di sviluppare una disbiosi polmonare ²¹. Cambiamenti nel microbiota possono permettere di discriminare tra diversi tipi di esacerbazioni di differente eziologia. Wang et al. hanno osservato una più ampia differenza nei cambiamenti del microbiota paragonando le riacutizzazioni batteriche con quelle eosinofile ²². Durante le riacutizzazioni batteriche gli autori hanno riportato una riduzione degli streptococchi e un aumento degli Haemofili, mentre le esacerbazioni eosinofile inducono una riduzione del rapporto Proteobatteri/Firmicutes ²². È stato osservato un sottogruppo di BPCO con un alto rapporto di Gammaproteobacteria/Firmicutes nell'espettorato durante un'esacerbazione. Questo è fortemente correlato alla riduzione del FEV₁ e all'incremento degli indicatori di infiammazione ^{23,24}. Una possibile spiegazione può essere data dal fatto che i Proteobatteri sono un phylum di batteri gram negativi che includono *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Haemophilus* and *Moraxella* che esplicano un'azione proinfiammatoria sulle vie aeree. Questi, quindi, potrebbero aumentare il livello di infiammazione polmonare determinando la riduzione del FEV₁ e l'aumento degli indici di infiammazione; d'altro canto i Firmicutes includono batteri gram positivi come gli

streptococchi e i lactobacilli che non mostrano tale azione proinfiammatoria. Si è osservato inoltre che il gruppo con alto rapporto Gammaproteobacteria/Firmicutes beneficia della terapia antibiotica rispetto ad altri gruppi di pazienti con alto o bilanciato rapporto Firmicutes/Gammaproteobacteria.

Studi più recenti condotti sull'espettorato di pazienti GOLD 2 e 3 in stato di stabilità e 6 giorni dopo un'esacerbazione, hanno confermato una variazione del microbiota corrispondente a un incremento di Firmicutes e Proteobatteri²³. Wilkinson et al. hanno dimostrato un aumentato rischio di riacutizzazione associato con l'isolamento di nuovi ceppi di batteri come *Moraxella Catarrhalis* nelle vie aeree di pazienti BPCO²³.

Virus nella BPCO stabile

Lo sviluppo dei metodi di PCR quantitativa ha permesso l'osservazione nelle basse vie aeree di pazienti BPCO stabili di una variegata comunità virale. Seemungal et al. hanno osservato la presenza di virus in aspirati nasali e campioni di sangue in pazienti con BPCO stabile²⁵. Gli autori hanno individuato Rhinovirus (RV), coronavirus, parainfluenza virus e clamidia in più del 16% dei campioni raccolti da 68 pazienti. Il virus respiratorio sinciziale (VRS) era il più isolato tra tutti i virus (27,5% dei campioni). Wilkinson et al. hanno osservato in uno studio longitudinale la persistenza di VRS nel 79,7% dei 74 pazienti arruolati e hanno dimostrato che la persistenza dei VRS nelle vie aeree del BPCO era correlata a più alti livelli di infiammazione e di declino della funzione respiratoria²⁶. La presenza di coronavirus e virus dell'influenza è stata confermata in campioni di tessuto polmonare da pazienti BPCO sottoposti a chirurgia per tumore polmonare. Gli autori hanno riportato una correlazione diretta tra la presenza di cellule infiammatorie e il carico totale virale²⁷.

Matsuse e colleghi²⁸ hanno evidenziato la presenza della proteina adenovirale E1A nelle vie aeree di pazienti con BPCO e hanno ipotizzato la possibilità di una infezione virale latente nei pazienti esaminati. Tale condizione potrebbe contribuire ad aumentare il danno e l'infiammazione causato dal fumo di sigaretta. Il virus di Epstein-Barr (VEB) e il citomegalovirus (CMV) sono stati trovati nelle vie aeree di pazienti affetti da BPCO ed è stato descritto che la prevalenza di VEB correla positivamente con la gravità della malattia e il grado di infiammazione²⁸.

Il significato di questa correlazione non è chiaro. Si potrebbe ipotizzare che gli herpesvirus riscontrati nelle vie aeree dei pazienti affetti da BPCO aumentino l'infiammazione aggravando la malattia o in alternativa che le alterazioni del sistema immunitario locale e l'infiammazione presente nei pazienti più compromessi associata

all'uso di steroidi inalatori ne favoriscano loro persistenza. Anche se la presenza di virus nelle vie aeree di BPCO stabili è ben documentata²⁹, questa è stata riportata con una percentuale molto variabile che va dal 6,25% al 79,7%^{30,26}. Questa variabilità può dipendere da tanti fattori tra cui l'uso di farmaci come steroidi, la gravità della malattia e il tempo di prelievo dei campioni. Altre possibili spiegazioni potrebbero essere date dalla mancanza di suscettibilità di alcuni gruppi di BPCO alle infezioni virali e dalla persistenza di alcuni virus nelle vie aeree³¹.

È stato osservato che il carico virale negli anelli bronchiali e nel parenchima polmonare di pazienti con BPCO lieve/moderata è simile a quello dei fumatori con funzione polmonare normale. Tali risultati, associati a livelli relativamente alti di markers virus correlati in campioni di tessuto dalle larghe vie aeree e dal parenchima polmonare, suggeriscono uno stato di attivazione della mucosa bronchiale in questi pazienti³².

Virus nella fase di riacutizzazione della BPCO

In questi ultimi anni è stato meglio definito il ruolo dei virus come trigger delle esacerbazioni nella BPCO. Due metanalisi^{33,34} hanno mostrato come la presenza di virus nel 40% delle esacerbazioni. Sono stati identificati prevalentemente: RV, influenza A, VRS, metapneumovirus, coronavirus, adenovirus e parainfluenzavirus^{34,35}. In pazienti ospedalizzati la presenza di virus respiratori è stata osservata nel 29,2% dei tamponi nasofaringei, aspirati bronchiali e campioni da lavaggio bronco alveolare. Il 60,2% di tutti i virus identificati erano picornavirus (VR o enterovirus) e influenza virus³⁶. La presenza di virus nelle vie aeree di soggetti con BPCO varia da circa il 60%²⁵ ad approssimativamente il 20%³⁷. Questa ampia variabilità potrebbe essere spiegata dalle differenze geografiche, dalla prevalenza dei frequenti esacerbatori nelle popolazioni studiate, dal diverso tempo e punto di raccolta dei campioni nelle vie aeree e dalle diverse tecniche di isolamento del virus³⁸.

Alcuni virus come i VRS possono causare sintomi gravi associati a una riduzione della funzione polmonare che dura per parecchie settimane³⁹. Questo è conseguenza del fatto che i VRS possono stimolare la produzione di citochine pro-infiammatorie come l'IL-8 nelle vie aeree di pazienti BPCO in maniera maggiore rispetto ai controlli sani⁴⁰. Seemungal et al. hanno osservato che i pazienti che hanno avuto una esacerbazione virale hanno una più alta mediana giornaliera del tempo totale di recupero dai sintomi, una più alta conta dei sintomi giornalieri e una più alta frequenza di esacerbazioni rispetto a quei pazienti che non hanno avuto un'infezione virale. Gli autori hanno isolato virus nel 64% degli 83

pazienti riacutizzati selezionati e hanno osservato una co-infezione con VRS e altri virus respiratori nel 6,5% dei pazienti ²⁵.

Mc Manus et al. hanno osservato un incremento della gravità della malattia in pazienti con co-infezione virale ⁴¹, mentre Ko et al. ³⁷ hanno riportato un aumento della gravità per quei pazienti con una positività della PCR nell'aspirato nasofaringeo e nelle colture virali rispetto a quelli con la positività solo della PCR nell'aspirato nasofaringeo. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che la positività della coltura virale indica la presenza di virus attivi e replicanti. La positività alla PCR per i virus dimostra solo la presenza del loro DNA/RNA, ma non dimostra la presenza di replicazione virale che induce la riacutizzazione a meno che non ne sia determinata la carica virale ⁴².

In un modello in vivo di riacutizzazione virale in BPCO con malattia moderata Mallia et al. ⁴³ hanno dimostrato la capacità del RSV di indurre una riacutizzazione dopo la sua inoculazione nelle vie aeree.

I virus possono alterare l'ambiente dell'ospite favorendo una infezione batterica secondaria. Pazienti con co-infezione batterica/virale hanno una grossa limitazione della funzione respiratoria e una più lunga degenza ospedaliera ⁴⁴. La co-infezione da virus e batteri nelle vie aeree di broncopatici cronici è in grado di stimolare una più alta produzione di citochine proinfiammatorie come la IL-6, di biomarkers di infiammazione come la proteina C reattiva e la procalcitonina rispetto a un'infezione causata da un solo agente eziologico ⁴⁵. Co-infezioni da virus e batteri sono state trovate in una percentuale relativamente alta di pazienti da Wilkinson et al. ^{30,46} e Papi et al. ^{30,46}. Questi autori hanno trovato virus rispettivamente nel 41% e nel 48% dei pazienti esacerbati e coinfezioni virali rispettivamente nel 29% e 25% dei campioni. Mallia et al. ⁴³ hanno osservato un'infezione batterica successiva nel 60% di pazienti infetti da RV. Risultati simili sono stati osservati da Molyneaux et al. ⁴⁷, che hanno descritto una sovra-crescita batterica, specialmente di *H. influenzae*, che persisteva per più di un mese dopo un'infezione sperimentale con RV in pazienti BPCO. I virus influenzali sono molto efficienti nel favorire la sovracrescita batterica e la successiva infezione secondaria da batteri patogeni come *S. aureus*, *S. pneumoniae*, e *H. influenzae* ⁴⁸ in soggetti normali e in pazienti BPCO. L'analisi di campioni di polmone ottenuti da persone decedute per influenza pandemica nel 1918 e nel 2009 ha mostrato che la causa più comune di morte era una polmonite batterica secondaria ⁴⁹. L'influenza aveva un decorso più grave in pazienti BPCO, aumentandone il rischio di morte ⁴⁹ e di ammissione in ospedale ⁵⁰ rispetto ai soggetti senza BPCO.

L'abilità dei virus respiratori nel favorire un'infezione

batterica secondaria è dovuta a numerosi fattori. Virus come quelli dell'influenza e RV sintetizzano proteine con attività immunosoppressiva. La proteina 1 non strutturale dell'influenza riduce l'attività del sistema della caspasi 1 ⁵¹, che è fondamentale contro le infezioni batteriche ⁵² e la proteina G dell'RV, in vitro, ostacola la produzione di interferone (IFN) alfa e beta e altera l'attività del sistema immunitario adattivo ⁵³. I virus respiratori possono usare a loro vantaggio certi meccanismi di morte cellulare come l'apoptosi, l'autofagia, la necroptosi e la piroptosi. Una delle funzioni di questi meccanismi è di aiutare il sistema immunitario nello stimolare la produzione di citochine proinfiammatorie e nel presentare componenti virali e batteriche alle cellule T per una risposta immune adattiva ⁵⁴. I virus respiratori influenzali sono forti induttori di apoptosi nelle fasi precoci di infezioni ma inducono piroptosi durante le fasi tardive di infezione ⁵⁵. L'emoagglutinina del virus dell'influenza e la proteina M2 stimolano entrambe l'autofagia, mentre la proteina M2 blocca il processo di fusione del lisosoma con l'autofagosoma ⁵⁶. In questo modo il virus riduce la possibilità per le cellule di degradare le sue componenti e usa gli autofagosomi per ottimizzare la propria replicazione ⁵⁷.

Le infezioni virali possono facilitare la colonizzazione batterica danneggiando direttamente le cellule epiteliali ⁵⁸ o favorendone l'espressione di molecole di adesione come la fibronectina, ICAM-1 e il recettore del fattore attivante le piastrine ⁵⁹.

I virus stimolando una risposta immunitaria di tipo Th1 aumentano i livelli di IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α ⁶⁰. Questa risposta polarizzata potrebbe alterare l'equilibrio tra la secrezione di IL-17 e IL-10 aumentando la suscettibilità a una successiva infezione batterica ⁶¹.

Le proteine NS1 e NS2 dell'VRS alterano direttamente la maturazione delle cellule dendritiche umane (CD) riducendone l'efficienza nella risposta immune ⁶². I virus dell'influenza sono capaci di inibire la funzione dei neutrofili. Il virus dell'influenza e l'VRS stimolano la secrezione di trappole extracellulari dei neutrofili (NETs) con una attività antimicrobica ridotta ⁶³, che diventano inefficaci nel catturare i batteri ma che potrebbero contribuire a peggiorare l'infiammazione e il danno tissutale nelle vie aeree.

Alterata risposta immunitaria verso batteri e virus nella BPCO

Macrofagi, cellule dendritiche, neutrofili e linfociti

I Macrofagi giocano un ruolo importante nell'orchestrare i processi infiammatori nei pazienti BPCO attraverso il

rilascio di mediatori proinfiammatori che includono proteasi, citochine, chemochine e molecole correlate allo stress ossidativo^{1,64}. In tali pazienti, queste cellule, hanno mostrato un'attività fagocitica ridotta che può aumentare la persistenza dei processi infiammatori e compromettere la clearance di batteri e virus patogeni^{39,65}. Questo potrebbe essere spiegato dall'osservazione che l'esposizione al fumo di sigaretta e agli inquinanti aerei danneggia l'attività fagocitica dei Macrofagi Alveolari (MA)⁶⁶. L'efferocitosi dei macrofagi, funzione che elimina i neutrofili e le cellule strutturali apoptotiche e così facendo previene il rilascio di molecole proinfiammatorie intracellulari, risulta anch'essa alterata in pazienti BPCO, specie dopo l'esposizione al fumo di sigaretta⁶⁷⁻⁶⁹. Un altro meccanismo alterato della fagocitosi/efferocitosi dei MA è l'alterazione della via di segnalazione della chinasi e la riduzione della produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive oxygen species* – ROS)⁷⁰. Queste alterazioni nella funzione dei macrofagi potrebbero contribuire ad aumentare il carico batterico e modificare la composizione del microbiota nelle vie aeree di pazienti BPCO. Le cellule dendritiche mature CD83+ sono ridotte nell'espettorato di pazienti BPCO stabili rispetto ai gruppi di controllo⁷¹. È stata osservata inoltre una riduzione di CD nell'epitelio e nella lamina propria rispetto a controlli sani⁷² e una diminuzione del recettore per le chemochine CCR5 espresso da CD e coinvolto nell'*uptake* di antigeni microbici⁷³. Questi dati supportano l'ipotesi di un funzionamento alterato delle CD nei BPCO. García-Valero et al. hanno osservato nelle vie aeree di pazienti affetti da BPCO una ridotta espressione di IFN- β , citochina prodotta da cellule dendritiche ma anche da macrofagi interstiziali e cellule epiteliali. Questa ridotta produzione potrebbe spiegare l'aumentata suscettibilità di questi pazienti alle infezioni virali acute⁷⁴. Più recentemente, è stata riportata, un'aumentata citotossicità delle cellule NK contro le cellule epiteliali polmonari primariamente mediata dall'attivazione delle cellule CD polmonari attraverso la via dell'IL-15 e dell'IL-15R α ⁷⁵. Le CD circolanti mostrano alla citometria un profilo di attivazione aumentato contribuendo a un incremento di cellule T CD8+ che producono IFN- γ e IL-17⁷⁶. Il numero di neutrofili è incrementato nell'espettorato, BAL, biopsie bronchiali e vie aeree periferiche dei pazienti BPCO rispetto ai controlli^{1,2,5}. Contemporaneamente sono aumentate le molecole che stimolano la migrazione e l'attivazione dei neutrofili. La proteina-1 infiammatoria dei macrofagi è aumentata nell'epitelio bronchiale di BPCO gravi rispetto a pazienti con malattia lieve o controlli fumatori². L'analisi delle chemochine proneutrofiliche mostra un maggior livello di RANTES (CCL5) e NAP-2 (CXCL7) in biopsie bronchiali di pazienti con BPCO grave com-

parati a controlli non fumatori^{2,77}. Ciò può contribuire a una maggiore permanenza di queste cellule nel tessuto bronchiale dei pazienti con BPCO grave. Mallia et al.⁷⁸ hanno osservato in pazienti infettati da rinovirus, durante l'esacerbazione, un aumentato reclutamento polmonare di neutrofili CD11b+. Il rilascio recentemente descritto delle NETs è un importante meccanismo immune che è capace di catturare i patogeni⁷⁹. Un eccesso nella formazione di NET danneggia l'epitelio e può condurre a un danno al tessuto polmonare osservato in pazienti con BPCO⁸⁰. La secrezione di NET è aumentata durante le infezioni respiratorie virali e questo potrebbe causare un danno ai tessuti aggiuntivo⁶³. L'evasione ai NET, da parte dei patogeni, potrebbe aumentarne la resistenza alle loro componenti microbicide, aumentando così il rischio di infezioni respiratorie nella BPCO⁸¹. Sono comunque necessari più studi dettagliati per meglio definire il ruolo della formazione dei NET e della loro evasione da parte dei patogeni nelle differenti condizioni cliniche dei pazienti BPCO⁸⁰. I linfociti, principalmente CD8+, sono isolati nelle biopsie bronchiali di pazienti BPCO con malattia lieve/moderata mentre il loro numero decresce con la progressione della malattia⁸². I linfociti campionati dal sangue periferico di pazienti BPCO mostrano una maggiore tendenza ad andare in apoptosi e una ridotta capacità di degranulare proteine citotossiche rispetto a linfociti di soggetti sani⁸³. La proliferazione di cellule T regolatorie, funzionalmente soppressive, osservate nelle vie aeree di pazienti BPCO contribuisce ulteriormente alla riduzione dell'attività delle cellule CD8+ in risposta a batteri e virus⁸⁴. Geerdink et al. hanno osservato risultati simili nel sangue di BPCO frequenti riacutizzatori descrivendo una riduzione nel numero delle cellule T CD4+ e delle cellule T CD8+ rispetto ai pazienti non frequenti riacutizzatori. Gli autori hanno ipotizzato che la causa fosse dovuta alla stimolazione cronica di un elevato numero di antigeni di batteri e virus persistenti nelle loro vie aeree. Secondo gli autori, la riduzione di questa popolazione di linfociti favorirebbe le frequenti esacerbazioni⁸⁵. Le alterazioni delle cellule infiammatorie in pazienti che sembrano essere più suscettibili alle riacutizzazioni indipendentemente dalla gravità della malattia dovrebbero essere meglio comprese³¹. Tutto ciò potrebbe permettere lo sviluppo di trattamenti personalizzati basati sulla risposta infiammatoria dei pazienti. Inoltre, si dovrebbe meglio comprendere come le alterazioni del sistema immune condizionino la risposta ai vari patogeni come batteri e virus.

Conclusioni

Studi recenti su pazienti BPCO stanno chiarendo il ruolo del microbiota nell'infiammazione e nel deterioramen-

to della funzione polmonare. Questi microorganismi possono influenzare la risposta del sistema immune innato e adattivo nei polmoni dei pazienti affetti da BPCO. Sono stati pubblicati dati promettenti che mostrano la stretta relazione tra la colonizzazione di batteri e virus e le conseguenze dell'alterazione di queste componenti sullo stato infiammatorio polmonare. Le complesse azioni che coinvolgono le cellule immunitarie, che attivano le risposte infiammatorie innate e cellulo-mediate interagendo con stimoli esterni batterici, virali e ossidanti, potrebbero essere responsabili delle conseguenze cliniche della limitazione al flusso irreversibile delle vie aeree, del rimodellamento polmonare e dell'enfisema che sviluppano questi pazienti.

Comprendere le dinamiche di questi cambiamenti strutturali e infiammatori, dovuti alla colonizzazione batterica e virale, in condizioni cliniche differenti e in differenti fenotipi di pazienti BPCO potrebbe migliorare la nostra conoscenza dei meccanismi patologici e molecolari sottostanti alla BPCO.

Bibliografia

- Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:16-27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011>
- Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FL, et al. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1156-1167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02030.x>
- Bagdonas E, Raudoniuote J, Bruzauskaite I, et al. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015;10:995-1013. <https://doi.org/10.2147/COPD.S82518>
- Agusti A, Faner R, Celli B, et al. Precision medicine in COPD exacerbations. *Lancet Respir Med* 2018;6:657-659. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30296-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30296-0)
- Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004;364:709-721. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16900-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16900-6)
- Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:957-963. <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0655OC>
- Cabrera-Rubio R, Garcia-Nunez M, Seto L, et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 2012;50:3562-3568. <https://doi.org/10.1128/JCM.00767-12>
- Miravittles M, Espinosa C, Fernandez-Laso E, et al. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. Study Group of Bacterial Infection in COPD. *Chest* 1999;116:40-46. <https://doi.org/10.1378/chest.116.1.40>
- Garcha DS, Thurston SJ, Patel AR, et al. Changes in prevalence and load of airway bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD. *Thorax* 2012;67:1075-1080. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-201924>
- Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, et al. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* 2000;109:288-295. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00507-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00507-6)
- Singh R, Mackay AJ, Patel AR, et al. Inflammatory thresholds and the species-specific effects of colonising bacteria in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2014;15:114. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0114-1>
- Barker BL, Haldar K, Patel H, et al. Association between pathogens detected using quantitative polymerase chain reaction with airway inflammation in COPD at stable state and exacerbations. *Chest* 2015;147:46-55. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0764>
- Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, et al. Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *PLoS One* 2012;7:e31976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031976>
- Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, et al. Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PLoS One* 2011;6:e16384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016384>
- Garcia-Nunez M, Millares L, Pomares X, et al. Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 2014;52:4217-4223. <https://doi.org/10.1128/JCM.01967-14>
- Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, et al. Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:438-445. <https://doi.org/10.1164/rccm.201502-0223OC>
- Mammen MJ, Sethi S. COPD and the microbiome. *Respirology* 2016;21:590-599. <https://doi.org/10.1111/resp.12732>
- Engel M, Endesfelder D, Schloter-Hai B, et al. Influence of lung CT changes in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) on the human lung microbiome. *PLoS One* 2017;12:e0180859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180859>
- Moghoofei M, Azimzadeh Jamalkandi S, Moein M et al. Bacterial infections in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Infection* 2020;48:19-35. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01350-1>
- Sethi S, Evans N, Grant BJ, et al. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002;347:465-471. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012561>
- Mayhew D, Devos N, Lambert C, et al. Longitudinal profiling of the lung microbiome in the AERIS study demonstrates repeatability of bacterial and eosinophilic COPD exacerbations. *Thorax* 2018;73:422-430. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210408>
- Wang Z, Bafadhel M, Haldar K, et al. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2016;47:1082-1092. <https://doi.org/10.1183/13993003.01406-2015>
- Jubenville E, Veillette M, Milot J, et al. Exacerbation induces a microbiota shift in sputa of COPD patients. *PLoS One* 2018;13:e0194355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194355>

- 24 Haldar K, Bafadhel M, Lau K, et al. Microbiome balance in sputum determined by PCR stratifies COPD exacerbations and shows potential for selective use of antibiotics. *PLoS One* 2017;12:e0182833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182833>
- 25 Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1618-1623. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.9.2105011>
- 26 Wilkinson TM, Donaldson GC, Johnston SL, et al. Respiratory syncytial virus, airway inflammation, and FEV1 decline in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:871-876. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1489OC>
- 27 Utokaparch S, Sze MA, Gosselink JV, et al. Respiratory viral detection and small airway inflammation in lung tissue of patients with stable, mild COPD. *COPD* 2014;11:197-203. <https://doi.org/10.3109/15412555.2013.836166>
- 28 Polosukhin VV, Cates JM, Lawson WE, et al. Bronchial secretory immunoglobulin a deficiency correlates with airway inflammation and progression of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:317-327. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1629OC>
- 29 Falsey AR, Formica MA, Hennessey PA, et al. Detection of respiratory syncytial virus in adults with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:639-643. <https://doi.org/10.1164/rccm.200510-1681OC>
- 30 Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1114-1121. <https://doi.org/10.1164/rccm.200506-859OC>
- 31 Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010;363:1128-1138. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909883>
- 32 D'Anna S, Maniscalco M, Carriero V, et al. Evaluation of innate immune mediators related to respiratory viruses in the lung of stable COPD patients. *J Clin Med* 2020;9:1807. <https://doi.org/10.3390/jcm9061807>
- 33 Wu X, Chen D, Gu X, et al. Prevalence and risk of viral infection in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2014;41:4743-4751. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3345-9>
- 34 Jafarinejad H, Moghoofei M, Mostafaei S, et al. Worldwide prevalence of viral infection in AECOPD patients: A meta-analysis. *Microb Pathog* 2017;113:190-196. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.021>
- 35 Mohan A, Chandra S, Agarwal D, et al. Prevalence of viral infection detected by PCR and RT-PCR in patients with acute exacerbation of COPD: a systematic review. *Respirology* 2010;15:536-542. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01722.x>
- 36 Visseaux B, Burdet C, Voiriot G, et al. Prevalence of respiratory viruses among adults, by season, age, respiratory tract region and type of medical unit in Paris, France, from 2011 to 2016. *PLoS One* 2017;12:e0180888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180888>
- 37 Ko FW, Ip M, Chan PK, et al. Viral etiology of acute exacerbations of COPD in Hong Kong. *Chest* 2007;132:900-908. <https://doi.org/10.1378/chest.07-0530>
- 38 George SN, Garcha DS, Mackay AJ, et al. Human rhinovirus infection during naturally occurring COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2014;44:87-96. <https://doi.org/10.1183/09031936.00223113>
- 39 D'Anna SE, Balbi B, Cappello F, et al. Bacterial-viral load and the immune response in stable and exacerbated COPD: significance and therapeutic prospects. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2016;11:445-453. <https://doi.org/10.2147/COPD.S93398>
- 40 Leigh R, Proud D. Virus-induced modulation of lower airway diseases: pathogenesis and pharmacologic approaches to treatment. *Pharmacol Ther* 2015;148:185-198. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.005>
- 41 McManus TE, Marley AM, Baxter N, et al. Respiratory viral infection in exacerbations of COPD. *Respir Med* 2008;102:1575-1580. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2008.06.006>
- 42 Lee N, Chan PK, Hui DS, et al. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. *J Infect Dis* 2009;200:492-500. <https://doi.org/10.1086/600383>
- 43 Mallia P, Footitt J, Sotero R, et al. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:1117-1124. <https://doi.org/10.1164/rccm.201205-0806OC>
- 44 Bafadhel M, McKenna S, Terry S, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:662-671.
- 45 Wilkinson TM, Hurst JR, Perera WR, et al. Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD. *Chest* 2006;129:317-324. <https://doi.org/10.1378/chest.129.2.317>
- 46 Wilkinson TMA, Aris E, Bourne S, et al. A prospective, observational cohort study of the seasonal dynamics of airway pathogens in the aetiology of exacerbations in COPD. *Thorax* 2017;72:919-927. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209023>
- 47 Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, et al. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1224-1231. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0341OC>
- 48 Ballinger MN, Standiford TJ. Postinfluenza bacterial pneumonia: host defenses gone awry. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30:643-652. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0049>
- 49 Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 2008;198:962-970. <https://doi.org/10.1086/591708>
- 50 Yap FH, Ho PL, Lam KF, et al. Excess hospital admissions for pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease, and heart failure during influenza seasons in Hong Kong. *J Med Virol* 2004;73:617-623. <https://doi.org/10.1002/jmv.20135>
- 51 Stasakova J, Ferko B, Kittel C, et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast

- apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol* 2005;86:185-195. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80422-0>
- 52 Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, et al. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000661. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000661>
- 53 Chirkova T, Boyoglu-Barnum S, Gaston KA, et al. Respiratory syncytial virus G protein CX3C motif impairs human airway epithelial and immune cell responses. *J Virol* 2013;87:13466-13479. <https://doi.org/10.1128/JVI.01741-13>
- 54 Choi ME, Price DR, Ryter SW, et al. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight* 2019;4. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128834>
- 55 Lee S, Hirohama M, Noguchi M, et al. Influenza A Virus Infection Triggers Pyroptosis and Apoptosis of Respiratory Epithelial Cells through the Type I Interferon Signaling Pathway in a Mutually Exclusive Manner. *J Virol* 2018;92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00396-18>
- 56 Gannage M, Dormann D, Albrecht R, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* 2009;6:367-380. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.005>
- 57 Hahn DR, Na CL, Weaver TE. Reserve autophagic capacity in alveolar epithelia provides a replicative niche for influenza A virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;51:400-412. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0437OC>
- 58 da Silva MC, Zahm JM, Gras D, et al. Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L543-551. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00256.2003>
- 59 van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, et al. Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L194-199. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00050.2005>
- 60 Sun K, Metzger DW. Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nat Med* 2008;14:558-564. <https://doi.org/10.1038/nm1765>
- 61 Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med* 2009;15:277-284. <https://doi.org/10.1038/nm.1929>
- 62 Munir S, Le Nouen C, Luongo C, et al. Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. *J Virol* 2008;82:8780-8796. <https://doi.org/10.1128/JVI.00630-08>
- 63 Narayana Moorthy A, Narasaraju T, Rai P, et al. In vivo and in vitro studies on the roles of neutrophil extracellular traps during secondary pneumococcal pneumonia after primary pulmonary influenza infection. *Front Immunol* 2013;4:56. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00056>
- 64 Postma DS, Reddel HK, ten Hacken NH, et al. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: similarities and differences. *Clin Chest Med* 2014;35:143-156. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2013.09.010>
- 65 Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011;378:1015-1026. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60988-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60988-4)
- 66 Lundborg M, Dahlen SE, Johard U, et al. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environ Res* 2006;100:197-204. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.08.007>
- 67 Kirkham PA, Spooner G, Rahman I, et al. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is compromised by matrix proteins modified by cigarette smoke and lipid peroxidation products. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:32-37. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.003>
- 68 Eltboli O, Bafadhel M, Hollins F, et al. COPD exacerbation severity and frequency is associated with impaired macrophage efferocytosis of eosinophils. *BMC Pulm Med* 2014;14:112. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-112>
- 69 Hodge S, Hodge G, Ahern J, et al. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:748-755. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0025OC>
- 70 Bewley MA, Preston JA, Mohasin M, et al. Impaired Mitochondrial Microbicidal Responses in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:845-855. <https://doi.org/10.1164/rccm.201608-1714OC>
- 71 Tsoumakidou M, Bouloukaki I, Koutala H, et al. Decreased sputum mature dendritic cells in healthy smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;150:389-397. <https://doi.org/10.1159/000226240>
- 72 Rogers AV, Adelroth E, Hattotuwa K, et al. Bronchial mucosal dendritic cells in smokers and ex-smokers with COPD: an electron microscopic study. *Thorax* 2008;63:108-114. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.078253>
- 73 Stoll P, Heinz AS, Bratke K, et al. Impact of smoking on dendritic cell phenotypes in the airway lumen of patients with COPD. *Respir Res* 2014;15:48. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-48>
- 74 Garcia-Valero J, Olloquequi J, Montes JF, et al. Deficient pulmonary IFN-beta expression in COPD patients. *PLoS One* 2019;14:e0217803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217803>
- 75 Finch DK, Stolberg VR, Ferguson J, et al. Lung dendritic cells drive natural killer cytotoxicity in chronic obstructive pulmonary disease via IL-15 α . *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198:1140-1150. <https://doi.org/10.1164/rccm.201712-2513OC>
- 76 Qiu SL, Kuang LJ, Tang QY, et al. Enhanced activation of circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and experimental smoking-induced emphysema. *Clin Immunol* 2018;195:107-118. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.11.003>
- 77 Caramori G, Casolari P, Barczyk A, et al. COPD immunopathology. *Semin Immunopathol* 2016;38:497-515. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0561-5>
- 78 Mallia P, Message SD, Contoli M, et al. Neutrophil adhesion molecules in experimental rhinovirus infection in COPD. *Respir Res* 2013;14:72. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-72>

- ⁷⁹ Storisteanu DM, Pocock JM, Cowburn AS, et al. Evasion of neutrophil extracellular traps by respiratory pathogens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;56:423-431. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0193PS>
- ⁸⁰ Porto BN, Stein RT. Neutrophil extracellular traps in pulmonary diseases: too much of a good thing? *Front Immunol* 2016;7:311. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00311>
- ⁸¹ Wang Y, Li M, Stadler S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 2009;184:205-213. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>
- ⁸² Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FLM, et al. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clinical and Experimental Allergy* 2004;34:1156-1167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02030.x>
- ⁸³ Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, et al. Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L492-499. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00428.2002>
- ⁸⁴ McKendry RT, Spalluto CM, Burke H, et al. Dysregulation of antiviral function of CD8(+) T cells in the chronic obstructive pulmonary disease lung: role of the PD-1-PD-L1 axis. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;193:642-651. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0782OC>
- ⁸⁵ Geerdink JX, Simons SO, Pike R, et al. Differences in systemic adaptive immunity contribute to the 'frequent exacerbator' COPD phenotype. *Respir Res* 2016;17:140. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0456-y>