

La supplementazione con antiossidanti ad alte dosi migliora la risposta clinica nelle riacutizzazioni della broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) trattata con antibioticoteraapia

Supplementation with high dose antioxidants improves clinical response in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) treated with antibiotic therapy

Summary

Background: despite the widespread availability of effective antibiotics, the microbiological eradication rate of acute exacerbation of chronic bronchitis (AECB) remains unacceptably low. Excessive oxidative stress is thought to be involved in low response rates to antibiotics, as well as in disease progression with an increase in AECB episodes. **Purpose:** to evaluate the effectiveness of a multi-component powdered supplement containing both antioxidants and immunostimulants in improving response rate to antibiotic treatment and reducing oxidative stress. The supplement was sealed in sachets. Each sachet contained: resveratrol (20 mg), vitamin C (180 mg), vitamin E (30 mg), vitamin A (1.2 mg), zinc (20 mg) and lactoferrin (25 mg). Study design: fifty-nine consecutive patients with AECB were treated in an open-label study. Twenty-eight patients were randomly chosen to receive ciprofloxacin alone (500 mg twice daily for 10 days) and thirty-one were chosen to receive the same antibiotic treatment plus one sachet/day of the above mentioned supplement. Response rate (partial plus complete response) was evaluated and oxidative stress was measured with the d-ROMs test. **Results:** the combined treatment resulted in a better rate of clinical success (85.7% vs. 76.9%; $p < 0.05$) and a lower number of therapeutic failures (14.2% vs. 23.0%; $p < 0.05$) at the end of the study. A significantly larger decrease in reactive oxygen metabolites (ROMs) was also observed in the patients who received the supplement (21.0%) than those who did not (6.0%). **Conclusion:** larger studies and laboratory research are needed to better understand the potential benefits of high doses of antioxidants to patients suffering from mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease.

Guarnieri R, Pappacoda A, Solitro S, et al. Supplementation with high dose antioxidants improves clinical response in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) treated with antibiotic therapy. *Trends Med* 2009; 9(3): 167-174.

© 2009 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

Rodolfo Guarnieri¹, Antonio Pappacoda², Sandro Solitro³, Roberto Cogo⁴

1: UO Riabilitazione respiratoria e servizio di fisiopatologia respiratoria, H Policlinico S. Marco Zingonia-Osio Sotto (BG)

2: Centro Pneumologico Ponte S. Pietro AO Treviglio (BG)

3: Pneumologia AO S. Antonio Abate, Trapani

4: Riabilitazione Respiratoria Cassano d'Adda AO Melegnano (MI)

Key words:
bronchitis
acute exacerbation
antibiotic*
ciprofloxacin
resveratrol
inflammation
oxidative stress

✉ **Rodolfo Guarnieri**

UO Riabilitazione respiratoria e servizio di fisiopatologia respiratoria - H Policlinico S. Marco
 Corso Europa, 7 - 24040 - Zingonia-Osio Sotto (BG)

Nei pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) le riacutizzazioni bronchiali sono un evento relativamente frequente, con prevalenza crescente in relazione alla gravità dello stadio clinico: nei soggetti in stadio GOLD II-IV le riacutizzazioni si verificano mediamente 2-4 volte per anno, e richiedono in circa un terzo dei pazienti l'ospedalizzazione con ingenti costi sanitari¹⁻³. Negli ultimi anni l'atteggiamento terapeutico da assumere in corso di riacutizzazioni è stato oggetto di controversie, in particolare circa l'effettiva efficacia del trattamento antibiotico⁴⁻⁶. Tuttavia, studi di microbiologia clinica e trial di confronto hanno verificato che: 1) nei pazienti con riacutizzazioni frequenti non trattati con antibiotico vi è incremento delle recidive rispetto alla controparte^{7,8}; 2) molte delle

riacutizzazioni sono sostenute sempre dai medesimi stipti batterici, suggerendo che cloni batterici possano in qualche modo sopravvivere all'azione antibiotica^{9,10}; 3) l'incremento delle riacutizzazioni sembra essere un fattore di peggioramento della storia clinica, accelerando il decorso della malattia^{11,12}; 4) con il peggiorare della BPCO si assiste al progressivo coinvolgimento nelle riacutizzazioni di patogeni "difficili", con maggior incidenza di *P. aeruginosa*, *S. aureus* ed *Enterobacteriaceae* rispetto alla triade più frequentemente isolata negli stadi iniziali della malattia (*S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *M. catarrhalis*)^{1,13}; 5) la maggior parte dei decessi nei pazienti con BPCO si verifica durante gli episodi di riacutizzazione^{14,15}. Infine, una recente meta-analisi ha confermato una riduzione della mortalità a breve termine, pari a circa il 2.2%, nelle riacutizzazioni trattate con antibioticoterapia rispetto a quelle non trattate¹⁶.

Le Linee Guida prevedono il trattamento antibiotico quando siano presenti almeno due dei tre sintomi cardinali di riacutizzazione (aumento della dispnea, aumento dell'escreato, aumento della purulenza) o quando almeno uno di tali sintomi si accompagni a febbre^{13,17}. In un ampio trial è stato possibile associare il viraggio in senso purulento dell'escreato a supercrescita batterica e ciò spiega perché in numerosi documenti di consenso esso sia divenuto un marker per iniziare il trattamento antibiotico^{18,19}. Il trattamento antibiotico, prevalentemente somministrato su base empirica, si avvale di penicilline protette, cefalosporine, macrolidi e fluorochinoloni respiratori, per via orale o iniettiva in relazione al *setting* e ad altri parametri funzionali ed anamnestici. I fluorochinoloni sono considerati per le loro caratteristiche farmacocinetiche (accumulo nei tessuti e fluidi respiratori) e per lo spettro di attività (la maggior parte dei patogeni respiratori) il golden standard nelle riacutizzazioni della BPCO, con tassi di guarigione clinica che si aggirano intorno all'85%²⁰⁻²².

Numerosi studi sperimentali hanno inoltre dimostrato che nelle riacutizzazioni si accentua lo stress ossidativo, già esasperato in condizioni basali, e tale incremento è ancora maggiore nei pazienti fumatori rispetto ai non fumatori²³⁻²⁵. Questa osservazione potrebbe spiegare i benefici clinici associati all'ossigenoterapia in corso di BPCO e quelli legati alla somministrazione di sostanze antiossidanti in gra-

do di riequilibrare la bilancia ossidativa^{22,26,27}. I benefici del trattamento antiossidante non sono ancora stati valutati compiutamente e, in alcuni trial con sostanze donatrici di gruppi tiolici (-SH), i miglioramenti rilevati dopo trattamento a lungo termine sono stati associati alla capacità di fluidificare il muco piuttosto che alla riduzione dello stress ossidativo²⁷.

Obiettivo di questo studio era verificare se l'aggiunta di un composto a base di resveratrolo ad un trattamento antibiotico standard fosse in grado di migliorare la risposta clinica in pazienti fumatori con riacutizzazione di BPCO. Studi sperimentali hanno dimostrato che resveratrolo è in grado di ridurre lo stress ossidativo e la flogosi respiratoria in pazienti con BPCO, inibendo il rilascio di citochine infiammatorie ed il reclutamento di neutrofili e macrofagi respiratori²⁸⁻³¹.

Pazienti e metodi

Pazienti

Sono stati inclusi 59 pazienti adulti (età media 62 anni) di sesso maschile, con diagnosi di BPCO di grado lieve-moderato ($FEV_1 \geq 50\%$ e $\leq 80\%$ del valore previsto e $FEV_1/FVC < 0.7$), liberi da altre patologie respiratorie ed in buone condizioni generali (tabella 1). Tutti i pazienti erano istruiti all'uso di un diario settimanale nel quale segnalare eventuali peggioramenti delle condizioni respiratorie basali, ed erano quindi noti i parametri relativi a dispnea, escreato e tosse in condizioni di stabilità. Sono stati esclusi i pazienti diabetici, con insufficienza epatica o renale, sottoposti ad antibioticoterapia recente (<3 mesi) o con ipersensibilità nota verso i fluorochinoloni: tutti i pazienti avevano in passato fatto uso di tali farmaci. Tutti i pazienti erano, o erano stati, fumatori.

Disegno dello studio

Lo studio è stato condotto in aperto. I pazienti sono stati randomizzati a ricevere alternativamente ciprofloxacina (CPF 500 mg bid per 10 giorni) o ciprofolxacina con la stessa schedula più un supplemento multicomponente granulare da assumere al mattino. Ciascuna bustina conteneva 5 sostanze con proprietà antiossidanti o immunofavorenti: resveratrolo (20 mg), latteoferrina (25 mg), vitamina C (180 mg), vitamina A (1.2 mg), vitamina E (30 mg), zinco (20 mg). Questo composto è stato assunto per ulteriori 2 giorni dopo il termine del trattamento antibiotico, per complessivi 12 giorni. I pazienti sono stati valutati all'inizio del trattamento (gior-

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti allocati a ricevere ciprofloxacina (CPF) o lo stesso antibiotico più un supplemento multicomponente (CPF/SUP).

Parametro	CPF (n°=28)	CPF/SUP (n°=31)
Età (anni)	61,6 (±6.7)	63,1 (±6.6)
Peso (kg)	72.6 (±5.8)	70.2 (±4.9)
Fumo (sigarette/giorno)		
-Ex fumatori	21%	29%
> 15/giorno	25%	29%
> 20/giorno	36%	23%
> 25/giorno	18%	19%
Stress ossidativo (Idroperossidi -UCARR-)	368.8	373.3
Score medio al basale (paziente stabile)	6.6	6.0
Score medio alla diagnosi di riacutizzazione	10.9	10.6
Febbre alla diagnosi (>37.6)	25.0	16.0
FEV1/FVC <0.7 (%)	93.0	97.0
Corticosteroidi inalatori (%)	39.0	45.0
Simpaticomimetici (%)	64.0	58.0
Anticolinergici (%)	46.0	55.0

no 1), al termine del trattamento antibiotico (giorno 10±2) e dopo ulteriori 5 giorni (giorno 15±3). Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione dello stress ossidativo con d-ROMs test all'inclusione ed al termine dello studio (giorno 15).

Valutazione di efficacia e tollerabilità

Valutazione clinica

L'efficacia dei trattamenti è stata valutata attraverso parametri clinici e strumentali (variazione dello stress ossidativo). La risposta clinica è stata definita come: 1) risposta completa (**RC**); 2) risposta parziale (**RP**); 3) fallimento terapeutico (**FT**). RC è stata definita come il ritorno al valore basale dei 5 parametri esaminati (tosse, quantità e colore dell'escreato, dispnea e febbre); RP era data dal miglioramento ≥50% rispetto al punteggio registrato in condizioni di stabilità (basale) dei summenzionati parametri; FT era classificata la variazione del punteggio complessivo dei 5 parametri <50%. Le risposte complete più le risposte parziali (**RC+RP**) costituivano il tasso di successo clinico (**SC**). Le valutazioni cliniche sono state eseguite al giorno 1 (diagnosi di riacutizzazione), quindi al giorno 10 in coincidenza con il termine del trattamento antibiotico, ed al giorno 15 (termine dello studio).

Tutti i pazienti inclusi in questo studio erano abituati a monitorare periodicamente le proprie condizioni respiratorie attraverso un diario a 5 items,

ciascuno con un punteggio da 0 (sintomo assente) a 3 (sintomo massimo), un sistema semplice ed in grado di individuare variazioni precoci rispetto al basale di: 1) tosse; 2) quantità di catarro; 3) colore del catarro; 4) dispnea; 5) temperatura corporea.

Parametri clinici utilizzati

La tosse è stata misurata come: 0 = assente; 1 = presente solo al mattino o raramente nella giornata; 2 = presente per tutto il giorno; 3 = disturba anche il sonno notturno. La quantità di catarro espettorato è stata misurata come: 0 = catarro assente; 1 = circa un cucchiaino da cucina; 2 = circa 2 cucchiaini da cucina; 3 = più di due cucchiaini da cucina. La purulenza era misurata come viraggio del colore dell'escreato: 0 = chiaro; 1 = chiaro con muco; 2 = giallastro-verde-marrone; 3 = assai denso e colorato come in 2. La dispnea era classificata come 0 = respiro normale; 1 = difficoltà a salire le scale o a camminare in salita per più di 5 minuti; 2 = mancanza di respiro nella deambulazione lenta; 3 = mancanza di respiro durante attività di cura della persona (vestirsi, pettinarsi, etc). Il punteggio per la febbre era: 0 = <37°C; 1 = 37.0-37.5°C; 2 = 37.6-38.0°C; 3 = ≥38°C.

Valutazione dello stress ossidativo

Lo stress ossidativo è stato valutato su campioni di siero ottenuto dopo microcentrifugazione di sangue venoso da puntura di polpastrello del dito me-

dio e processati secondo le indicazioni per la valutazione degli idroperossidi con d-ROMs® test (Diacron International Srl - Grosseto - Italy)^{32,33}. Questo test si è dimostrato semplice da eseguire e dotato di elevata sensibilità nel dosaggio degli idroperossidi, metaboliti reattivi dell'ossigeno (Reactive Oxygen Metabolites -ROM-). La concentrazione di idroperossidi (H₂O₂) nel campione è espressa in Unità Carratelli (U CARR), dove 10 UCARR corrispondono a 0.8 mg H₂O₂/L di siero. In condizione di equilibrio ossidativo (popolazione apparentemente sana), le concentrazioni di idroperossidi sono <300 UCARR, valori che possono invece raggiungere 400 UCARR nei fumatori.

Analisi statistica

La dimensione del campione è stata calcolata sulla base dei tassi di risposta attesi e con un drop-out previsto <10%. I dati sono espressi come valore medio \pm deviazione standard (DS). È stato utilizzato il test *t* di Student per le coppie di dati oggetto di studio. La significatività statistica è stata fissata per valori di $p < 0.05$.

Risultati

Cinquantaquattro pazienti su 59 inclusi (92%) hanno terminato lo studio e sono risultati valutabili sia al termine del trattamento antibiotico (giorno 10) sia al termine dello studio (giorno 15). Cinque pazienti, 3 del gruppo in supplementazione e 2 del gruppo in monoterapia antibiotica non si sono presentati alle visite di controllo, o si sono presentati fuori tempo previsto e non sono stati inclusi nella valutazione di efficacia. Complessivamente sono risultati quindi valutabili 54 pazienti: 26 del braccio allocato a ciprofloxacina e 28 del braccio allocato a trattamento antibiotico più supplemento.

Efficacia clinica

Al termine del trattamento antibiotico (giorno 10) risposte parziali si sono registrate in 16 pazienti del gruppo in monoterapia con ciprofloxacina (61.5%) ed in 17 pazienti del gruppo che assumeva anche il supplemento (60.7%). Risposte complete sono state osservate in 4 pazienti in monoterapia antibiotica (15.3%) ed in 6 pazienti in regi-

me combinato (21.4%). Fallimento terapeutico è stato registrato nei rimanenti 6 pazienti in terapia con ciprofloxacina (23.0%) e nei rimanenti 5 pazienti (17.8%) in terapia combinata (figura 1).

Complessivamente quindi, successo clinico (remissione completa o miglioramento $\geq 50\%$) è stato ottenuto in 20 pazienti trattati con monoterapia antibiotica (76.9%) ed in 17 pazienti nei pazienti che ricevevano l'associazione con antiossidanti (82.1%) ($p < 0.05$).

Alla visita di follow-up, eseguita al giorno 15, si sono osservate alcune variazioni: 1 paziente giudicato non responder al giorno 10, appartenente al gruppo in terapia combinata, aveva nel frattempo migliorato il punteggio dell'escreato, ed è stato quindi riclassificato come risposta parziale. Inoltre, 2/17 pazienti classificati al giorno 10 come risposte parziali erano al controllo finale ritornati allo score basale, e sono quindi stati valutati come risposte complete. Nei trattati con monoterapia antibiotica non vi è stato miglioramento dei fallimenti e 2/16 pazienti in remissione parziale hanno migliorato lo score e sono stati riclassificati come risposte complete. Al termine dello studio (visita 3) quindi, i successi sono aumentati ulteriormente, ma in misura sensibilmente maggiore per il braccio in supplementazione attiva (tabella 2). Al termine dello studio la differenza fra i due bracci è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$) sia per il tasso di successi clinici (76.9% vs 85.7%) che per i fallimenti (14.2% vs 23.0%).

Figura 1. Efficacia clinica al termine del trattamento antibiotico.

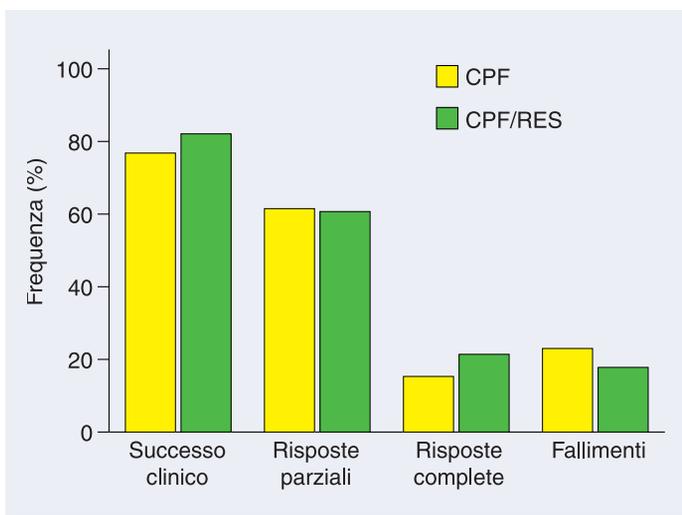


Tabella 2. Tassi di successo clinico (SC), risposte complete (RC), risposte parziali (RP) e fallimenti terapeutici (FT) al termine dello studio.

End-point	CPF (n=26)	CPF/SUP (n=28)	p
SC	20/26 (76.9%)	24/28 (85.7%)	<0.05
RC	6/26 (23.0%)	8/28 (28.5%)	<0.05
RP	14/26 (53.8%)	16/28 (57.1%)	ns
FT	6/26 (23.0%)	4/28 (14.2%)	<0.05

La differenza fra i due regimi è apparsa correlata prevalentemente al maggior effetto osservato sull'escreato, in termini di quantità espettorata e di purulenza: fra l'inizio dello studio e la fine (giorno 15), la quantità di escreato si è ridotta del 20% nei trattati con monoterapia antibiotica e del 36.3% nei pazienti in regime combinato; miglioramenti analoghi sono stati osservati sulla purulenza, ridotta del 29% e del 46% rispettivamente (tabella 3).

Entrambi i trattamenti sono risultati efficaci e ben tollerati. Gli effetti avversi più frequenti sono stati i disturbi gastrointestinali (vomito, piroso, dolore gastrico), comparsi complessivamente in 5 pazienti, 3 del gruppo CPF e 2 appartenenti al braccio in terapia combinata.

Effetti sullo stress ossidativo

Le concentrazioni di idroperossidi registrate al basale erano pari a circa 370 UCARR nella popolazione inclusa. La somministrazione di un multicomponente a base di resveratrolo per 12 giorni ha ridotto lo stress ossidativo del 21% ($p<0.05$) nei supplementati, da 373.3 UCARR al basale a 294.9 UCARR al termine dello studio, contro una riduzione assai più modesta

osservata nei pazienti trattati con monoterapia antibiotica (-6.0%; $p=ns$).

Discussione

I tassi di risposta osservati nel braccio in monoterapia antibiotica sono risultati simili a quelli registrati in altri trial con fluorochinoloni o cefalosporine orali in pazienti con BPCO che avevano all'inclusione le stesse caratteristiche cliniche del nostro campione^{34,35}. Nel nostro caso tuttavia i tassi di risposta al termine dello studio nel braccio che era stato supplementato sono risultati maggiori di quelli riscontrati in precedenza, con un guadagno dei successi clinici pari a circa il 10%.

Questi risultati sono statisticamente significativi per i SC, RC e FT e suggeriscono una tendenza che andrebbe meglio approfondita con studi di maggiori dimensioni e con l'ausilio di indagini microbiologiche sull'escreato (tassi di eradicazione batterica) e sul liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL), per individuare in che misura la presenza di un antiossidante assai potente come il resveratrolo abbia alterato la risposta umorale e cellulare. Il differente tasso

Tabella 3. Effetti del trattamento sui parametri clinici e sullo stress ossidativo (idroperossidi) al termine dello studio.

Parametro	CPF (n=26)			CPF/SUP (n=28)		
	T0	T10	T15	T0	T10	T15
Tosse	48	32	31	49	30	33
Escreato (quantità)	49	37	39	44	31	28
Escreato (purulenza)	55	38	39	52	32	28
Dispnea	54	41	37	50	40	37
Febbre	13	0	0	7	0	0
Score medio/paziente	10.9	7.4	7.3	10.6	7.0	6.7
Idroperossidi (UCARR)	368.8	—	346.6	373.3	—	294.9

di risposta osservato nei soggetti supplementati potrebbe essere associato o alla riduzione dello stress ossidativo, indotto dalle alte dosi di sostanze antiossidanti presenti nel supplemento in studio o dalla migliore risposta immunitaria locale favorita dalla presenza di lattoferrina nel supplemento.

Poiché resveratrolo non esercita effetto mucolitico, l'azione osservata sul viraggio dell'escreato in senso meno purulento suggerirebbe una maggior penetrazione dell'antibiotico nei fluidi di contatto con l'epitelio bronchiale (Epithelial Lining Fluid - ELF) e/o nello stesso muco, un ambiente notoriamente poco pervio alle molecole antibiotiche. In tal senso lo studio dei tassi di eradicazione microbiologica sarebbe stata di grande utilità. In che modo resveratrolo potrebbe esercitare tale effetto non è noto.

Alcuni studi hanno dimostrato un incremento dello stress ossidativo e della flogosi (locale e sistemica) in corso di riacutizzazione^{25,36}. L'interferenza di resveratrolo con lo stress ossidativo e con la liberazione di metalloproteinasasi ed altre molecole infiammatorie dai macrofagi alveolari già iperattivati in corso di riacutizzazione bronchiale è stata ripetutamente dimostrata³⁷⁻³⁹. Nel nostro studio quindi gli effetti benefici dell'assunzione di antiossidanti potrebbero essere ascritti alla azione antinfiammatoria e di compenso dello squilibrio ossidativo. Tali effetti potrebbero essere maggiori di quanto normalmente osservato negli studi su pazienti con BPCO. Il 70-80% dei pazienti inclusi in questo studio erano fumatori, di questi il 20% fumava oltre 1 pacchetto al giorno. Il fumo induce, indipendentemente dalla riacutizzazione, reclutamento di macrofagi e loro stimolazione a produrre ulteriori mediatori infiammatori, un'azione che va a rinforzare quella già indotta dalla riacutizzazione in sé, in un circolo vizioso che non ha

possibilità di estinguersi se non cessando il fumo^{25,36,40}.

I pazienti con BPCO forti fumatori necessitano più di qualunque altro gruppo di "spegnere il fuoco ossidativo" che si genera durante una riacutizzazione e la somministrazione di antiossidanti andrebbe presa in considerazione in questa vasta popolazione di bronchitici cronici. In tal senso è opportuno ricordare che nessuno dei pazienti da noi studiati ha dichiarato di avere sospeso completamente il fumo durante la riacutizzazione e solo un terzo avrebbe ridotto il numero di sigarette fumate per giorno, ivi compresi gli 8 pazienti con febbre all'inclusione.

La neutralizzazione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) direttamente assunti (o indotti) dal fumo di sigaretta può costituire un'altra utile ragione per favorire l'assunzione di composti antiossidanti a base di resveratrolo. La mancata neutralizzazione dei ROS altera in poco tempo la bilancia ossidativa a favore di un'eccedenza di ROS, che restano liberi di agire direttamente sull'epitelio bronchiale, ossidando proteine, lipidi di membrana e sistemi enzimatici di protezione^{41,42}.

A conferma dei benefici di un adeguato introito di antiossidanti con la dieta sulla progressione e sulla mortalità della BPCO vi sono interessanti studi longitudinali^{43,44}. Studi clinici di più ampie dimensioni sono quindi necessari sia per valutare le modalità con cui resveratrolo ad altri polifenoli esercitano la loro azione protettiva sul tratto respiratorio, sia per quantificarne i benefici, per esempio in termini di riduzione dell'infiammazione (ridotta necessità di corticosteroidi inalatori) e di numero di recidive per anno. Si deve inoltre ipotizzare che tali benefici non siano evidenti se non con l'assunzione cronica (o ciclica) di queste sostanze, essendo il fumatore con BPCO in permanente stress ossidativo. **TM**

Bibliografia

1. Anzueto A, Sethi S, Martinez FJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:554-564.
2. Miravittles M, Murio C, Guerrero T, et al; DAFNE Study Group. Pharmacoeconomic evaluation of acute exacerbations of chronic bronchitis and COPD. *Chest* 2002; 121:1449-1455.
3. Friedman M, Hilleman DE. Economic burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacoeconomics* 2001; 19:245-254.
4. Wilson R, Jones P, Schaberg T for the MOSAIC Study Group. Antibiotic treatment and factors influencing short and long term outcomes of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Thorax* 2006; 61 337-342.
5. Miravittles M, Llor C, Naberan K, for the EFE-MAP study group. Variables associated with recovery from acute exacerbations of chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir*

- Med 2005; 99:955-965.
6. **Puhan MA, Vollenweider D, Latshang T, et al.** Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: when are antibiotics indicated? A systematic review. *Respir Res* 2007; 8:30.
 7. **Martinez FJ, Han MK, Flaherty K, et al.** Role of infection and antimicrobial therapy in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4:101-124.
 8. **Puhan MA, Vollenweider D, Steurer J, et al.** Where is the supporting evidence for treating mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease exacerbations with antibiotics? A systematic review. *BMC Med* 2008; 6:28.
 9. **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.
 10. **Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, et al.** Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:266-272.
 11. **Sethi S, Maloney J, Grove L, et al.** Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:991-998.
 12. **Sethi S, Murphy TF.** Acute exacerbations of chronic bronchitis: new developments concerning microbiology and pathophysiology—impact on approaches to risk stratification and therapy. *Infect Dis Clin North Am* 2004; 18:861-882.
 13. **Fabbri L, Pauwels RA, Hurd SS;** GOLD Scientific Committee. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary updated 2003. *COPD* 2004; 1:105-141.
 14. **Ekberg-Aronsson M, Pehrsson K, Nilsson JA, et al.** Mortality in GOLD stages of COPD and its dependence on symptoms of chronic bronchitis. *Respir Res* 2005; 6:98.
 15. **Holguin F, Folch E, Redd SC, et al.** Comorbidity and mortality in COPD related hospitalization in United States, 1979 to 2001. *Chest* 2005; 128:2005-2011.
 16. **Ram FSF, Rodriguez-Roisin R, Granatos-Navarrete A, et al.** Antibiotics for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 2: CD004403.
 17. **Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD).** Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: updated 2008. www.goldcopd.com.
 18. **Allegra L, Blasi F, Diano P, et al.** Sputum color as a marker of acute bacterial exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2005; 99:742-747.
 19. **Blasi F, Ehig S, Torres A, et al.** A review of guidelines for antibacterial use in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Pulm Pharmacol Ther* 2006; 19:361-369.
 20. **Canut A, Martín-Herrero JE, Labora A.** What are the most appropriate antibiotics for the treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? A therapeutic outcomes model. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:605-612.
 21. **Mensa J, Trilla A.** Should patients with acute exacerbation of chronic bronchitis be treated with antibiotics? Advantages of the use of fluoroquinolones. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (Suppl 3):42-54.
 22. **O'Donnell DE, Hernandez P, Kaplan A, et al.** Canadian Thoracic Society recommendations for management of chronic obstructive pulmonary disease - 2008 update - highlights for primary care. *Can Respir J* 2008; 15 (Suppl A):1A-8A.
 23. **Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, et al.** Increased serum concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *Eur Respir J* 2005; 25:885-890.
 24. **Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, et al.** Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*. 2005; 60:293-300
 25. **Verhoeven GT, Wijkhuijs AJ, Hooijkaas H, et al.** Effect of an inhaled glucocorticoid on reactive oxygen species production by bronchoalveolar lavage cells from smoking COPD patients. *Mediators Inflamm* 2000; 9:109-113.
 26. **Pela R, Calcagni AM, Subiaco S, et al.** N-acetylcysteine reduces the exacerbation rate in patients with moderate to severe COPD. *Respiration* 1999; 66:495-500.
 27. **Rasmussen JB, Glennow C.** Reduction in days of illness after long-term treatment with N-acetylcysteine controlled-release tablets in patients with chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1988; 1:351-355.
 28. **Culpitt SV, Rogers DF, Fenwick PS, et al.** Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax* 2003; 58:942-946.
 29. **Das S, Das DK.** Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007; 6:168-173.
 30. **Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, et al.** Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287:L774-L783.
 31. **Santus P Sola A, Carlucci P et al.** Lipid peroxidation and 5-lipoxygenase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:838-843.
 32. **Alberti A.** The d-ROM test, Model and chemical basis. I.Co.C.E.A. National Council of Research. Researc Area. Bologna Italy. Experimental Report 1997.
 33. **Alberti A, Bolognini L, Caratelli M et al.** Assessing oxidative stress with the d-ROM test. Some mechanistic considerations. Proceedings of the SFRR Europe Summer Meeting 26-28 June 1997, Abano Terme Italy P82-83.
 34. **Grassi C, Salvatori E, Rosignoli MT, et al;** and the Prulifloxacin Study Group. Randomized, double-

- blind study of prulifloxacin versus ciprofloxacin in patients with acute exacerbations of chronic bronchitis. *Respiration* 2002; 69:217-222.
35. **Alvarez-Sala J-L, Kardos P, Martínez-Beltrán J, et al.** Clinical and bacteriological efficacy in treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis with cefditoren-pivoxil versus cefuroxime-axetil. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1762-1767.
 36. **Siva R, Green RH, Brightling CE, et al.** Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. *Eur Respir J* 2007; 29:906-913.
 37. **Baolin L, Inami Y, Tanaka H, et al.** Resveratrol inhibits the release of mediators from bone marrow derived mouse mast cells in vitro. *Planta Med* 2004; 70:305-309.
 38. **Birrell MA, McCluskie K, Wong S, et al.** Resveratrol, an extract of red wine, inhibits lipopolysaccharide induced airway neutrophilia and inflammatory mediators through an NF-kappaB-independent mechanism. *FASEB J* 2005; 19:840-841.
 39. **Biswas S, Rahman I.** Modulation of steroid activity in chronic inflammation: a novel anti-inflammatory role for curcumin. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:987-994.
 40. **Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, et al.** Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 2005; 26:835-845.
 41. **Polzin GM, Kosa-Maines RE, Ashley DL, et al.** Analysis of volatile organic compounds in mainstream cigarette smoke. *Environ Sci Technol*. 2007; 41:1297-302.
 42. **Rahman I, MacNee W.** Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 1999; 277 (6 Pt 1):L1067-L1088.
 43. **Tabak C, Smit HA, Heederik D.** Diet and chronic obstructive pulmonary disease: independent beneficial effects of fruits, whole grains, and alcohol (the MORGEN study). *Clin Exp Allergy* 2001; 31:747-755.
 44. **Walda IC, Tabak C, Smit HA, et al.** Diet and 20-year chronic obstructive pulmonary disease mortality in middle-aged men from three European countries. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:638-643.