

OSSIDO NITRICO

Marcello Cottini

Specialista Allergologia e Immunologia Clinica

Specialista Malattie Apparato Respiratorio

Libero Professionista, Bergamo

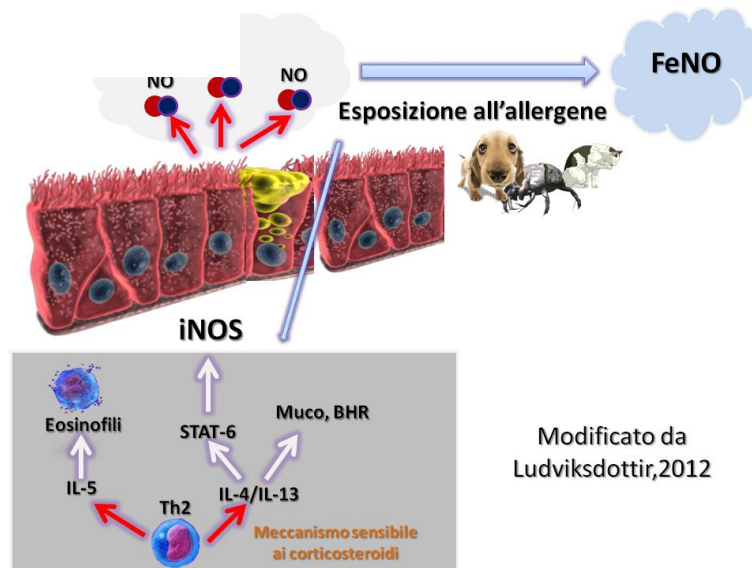
Cenni storici

Per molti anni l'ossido nitrico (monossido di azoto, formula chimica NO), un radicale libero dalla breve emivita, è stato essenzialmente considerato un pericoloso inquinante ambientale, presente nello smog fotochimico e nel fumo di sigaretta (1). Dalla fine degli anni '70 è apparsa però chiara l'importanza dell'ossido nitrico in molte funzioni biologiche del nostro organismo; in particolare, a livello dell'apparato respiratorio NO agisce, a basse concentrazioni, come mediatore in una serie di risposte fisiologiche importanti per lo sviluppo del polmone (dilatazione del muscolo liscio, protezione verso stimoli bronco-costrittori, motilità ciliare), e come neurotrasmettitore del sistema nervoso inibitorio non adrenergico-non colinergico; ad alte concentrazioni svolge invece un ruolo come mediatore dell'infiammazione e nei meccanismi citotossici/citostatici di difesa verso agenti patogeni e cellule tumorali (2). L'utilizzo di analizzatori a chemiluminescenza ha consentito negli anni '80 a diversi ricercatori di studiare l'ossido nitrico nell'aria esalata di animali ed umani, e questo ha portato, all'inizio degli anni '90, a scoprire concentrazioni più elevate di NO nell'aria esalata dei pazienti asmatici, aprendo una nuova era nella Medicina Respiratoria (3).

Biosintesi e regolazione

Nel polmone l'ossido nitrico è prodotto da differenti tipi cellulari, fra cui cellule epiteliali, terminazioni nervose, cellule infiammatorie (macrofagi, neutrofilo, mastociti) e cellule endoteliali vascolari; NO viene sintetizzato dall'atomo di azoto terminale guanidinico dell'aminoacido semi-essenziale L-arginina, mediante l'attività dell'enzima NO-sintetasi (NOS). Da linee cellulari umane sono state finora clonate tre diverse isoforme di NOS: la forma endoteliale (eNOS) e quella neuronale (nNOS), insieme denominate forme costitutive (cNOS), e la forma inducibile (iNOS). Le cNOS, presenti a livello dell'endotelio, delle cellule nervose e dell'epitelio bronchiale, sono enzimi che vengono attivati in seguito all'interazione di vari agonisti, come l'acetilcolina, l'istamina e la bradichinina, con i recettori presenti sulla superficie cellulare. Questi enzimi sono in grado di produrre piccole quantità (picomoli) di NO nel giro di pochi secondi/minuti. L'aumento dei livelli di NO nell'aria esalata degli asmatici è però attribuibile a "over-espressione" dell'enzima iNOS; studi di immunoistochimica hanno infatti dimostrato la presenza di iNOS nelle cellule epiteliali di biopsie bronchiali di soggetti asmatici ma non nei soggetti sani, nei quali sono state individuate solo le cNOS. Le iNOS sono presenti nelle cellule solo dopo attivazione da parte di endotossine e di citochine pro-infiammatorie, quali l'interleuchina 1 β (IL-1 β), l'interferon γ (IFN- γ) e il tumor necrosis factor α (TNF- α) (3); negli ultimi anni è stato però evidenziato il ruolo essenziale delle citochine Th2 (IL-4, IL-13) nell'up-regolare iNOS a livello dell'epitelio bronchiale, via STAT-6 (4) (fig.1).

Figura 1



Modificato da
Ludviksdottir,2012

Le iNOS rilasciano in maniera continuativa (ore/giorni), elevate quantità (nanomoli) di NO. Nei soggetti asmatici è stato dimostrato che l'NO può essere espresso dalle cellule dell'epitelio bronchiale, dai macrofagi alveolari e dagli eosinofili. La sintesi dell'iNOS è inibita dai corticosteroidi che non interferiscono invece con le cNOS (3). Negli ultimi anni è risultato evidente che l'aria esalata a livello nasale contiene concentrazioni di NO decisamente più elevate e i seni paranasali sono stati identificati fonte principale della molecola nei soggetti normali, suggerendo l'ipotesi che le cNOS nell'epitelio dei seni paranasali ed, in misura minore, nell'epitelio nasale, contribuiscano grandemente alla formazione di NO (5).

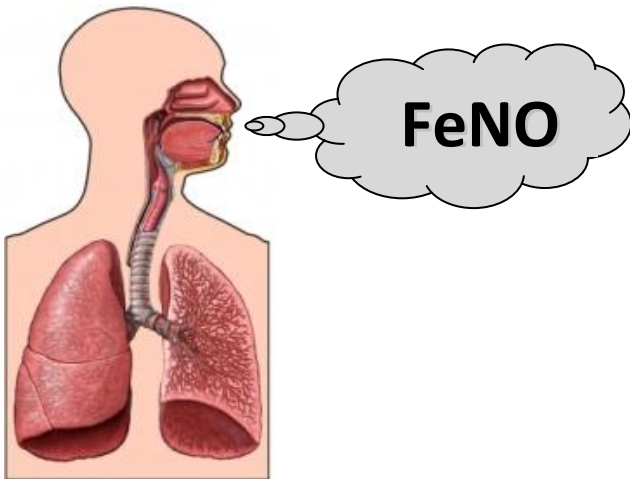
Raccomandazioni per la misurazione dell'ossido nitrico nell'aria espirata

Inizialmente gli strumenti utilizzati per la misurazione si basavano sul fenomeno della chemiluminescenza ma recentemente sono stati introdotti strumenti, portatili e dai costi decisamente ridotti, contenenti un sensore elettro-chimico che, a contatto con l'NO contenuto nell'aria espirata, rileva variazioni di corrente o di potenziale proporzionali alla concentrazione dell'NO nel campione biologico (elettro-analisi) (6). La misurazione della frazione del monossido di azoto nell'aria espirata (fraction of exhaled nitric oxide, FeNO), è una metodica non-invasiva, standardizzata e validata da numerose linee guida, tra cui quelle dell'American Thoracic Society (ATS) e della European Respiratory Society (ERS) (6,7). Le concentrazioni di NO nell'aria espirata, espresse in parti per bilione (ppb), sono sovrapponibili a quelle misurate in endoscopia a livello bronchiale, il che conferma l'origine del gas a livello delle vie aeree inferiori. I valori di FeNO sono flusso-dipendenti, in quanto la diffusione dell'NO nel lume bronchiale dipende dal tempo di transito dell'aria espirata nelle vie aeree. Per tale motivo ERS e ATS raccomandano di eseguire almeno 3 misurazioni riproducibili (variabilità di circa il 5%) ad un flusso espiratorio costante di 50 ml/sec, che in genere è mantenuto agevolmente dal paziente. La durata del test è di 10 secondi, tempo necessario al raggiungimento del plateau delle concentrazioni di FeNO nell'aria espirata. Quando si misurano le concentrazioni nell'aria espirata di NO proveniente dalle vie aeree inferiori, è importante escludere il contributo dell'ossido nitrico prodotto nelle cavità nasali, in quanto le concentrazioni di NO nasale sono molto più alte di quelle raggiunte nell'aria espirata bronchiale. Per ridurre al minimo la "contaminazione" nasale, l'espirazione è eseguita a flusso-costante contro una resistenza espiratoria (6).

Fattori influenzanti i valori di FeNO

Sulla base di studi di popolazione condotti in soggetti asmatici e non, i principali determinanti dei valori di FeNO sono risultati : età, altezza, sesso e, in misura rilevante, infezioni virali e fumo di sigaretta (soprattutto attivo, ma anche passivo). Dati contrastanti emergono in letteratura rispetto al ruolo dell' atopia , della rinite e di altri fattori (8) (Fig. 2).

Fig. 2



Valori elevati

- Età (> 65 aa)
- Altezza
- Sesso (maschile)
- Etnia (asiatica)
- Atopia (>>allergeni perenni)
- Rinite
- Infezioni virali (>> Rhinovirus)
- Dieta ricca di nitrati (es. lattuga/spinaci)

Valori ridotti

- Età (< 12 aa)
- Fumo attivo/passivo
- Discinesia ciliare
- Obesità
- Ostruzione bronchiale
- Precedenti manovre spirometriche
- Esercizio fisico

Applicazioni cliniche

FeNO come biomarker di infiammazione delle vie aeree

L'asma è considerata una eterogenea malattia infiammatoria cronica, associata a iperreattività bronchiale. In accordo con le linee guida Global Initiative on Asthma (GINA) 2015, la diagnosi di asma dovrebbe basarsi su un pattern di sintomi caratteristici e su una variabile limitazione al flusso aereo evidenziata dal test di reversibilità con broncodilatatore (9). La misura del FeNO può però essere di aiuto nella diagnosi di asma, ovviamente in associazione ai dati clinici/funzionali, e una recente meta-analisi ha concluso che la combinazione di FeNO e test di reversibilità ha la massima accuratezza diagnostica e si dimostra "cost-effective"(10). Ad analoghe conclusioni giunge un documento ufficiale NICE (National Institute for Health and Care Excellence, UK, gennaio 2015), che, dopo aver enfatizzato il rischio di sovradiagnosi di asma nella Medicina Generale, raccomanda la misurazione del FeNO nella diagnosi della malattia, anche in base a criteri di "cost-effectiveness"(11). Va però ricordato che valori elevati di FeNO sono riscontrati anche nella bronchite eosinofila, in alcuni pazienti con BPCO e in pazienti sensibilizzati esposti all'allergene (soprattutto se affetti da rinite). Appare pertanto più importante per il clinico considerare FeNO come un efficace biomarker di infiammazione delle vie aeree. Sono stati descritti negli ultimi anni differenti fenotipi infiammatori, la cui identificazione appare assai utile per aiutare nella scelta e nel management terapeutico. Gran parte dei pazienti con "early-onset asthma" e circa la metà di quelli con "adult-onset asthma" mostrano un fenotipo infiammatorio eosinofilo, e il FeNO è stato a lungo considerato un marker surrogato di infiammazione eosinofila. Diversi studi hanno infatti evidenziato che, in pazienti asmatici, valori di FeNO elevati si associano alla presenza di eosinofili a livello ematico, nello sputo indotto, nel liquido di lavaggio bronco alveolare e nella mucosa bronchiale (12,13). In base a questi dati, nel 2011 un documento ufficiale dell'ATS ha

raccomandato l'uso del FeNO nella diagnosi di infiammazione eosinofila delle vie respiratorie (raccomandazione "strong" secondo GRADE) (14). Va però segnalato che la correlazione con gli eosinofili nel sangue e, soprattutto, nell'espettorato sputo indotto è risultata modesta in molti studi; non sorprendentemente, recenti lavori indicano che FeNO è maggiormente rappresentativo di una "locale" infiammazione Th2, soprattutto a livello della mucosa bronchiale (vedi Figura 1), più che di una generale infiammazione eosinofila, meglio evidenziata dall'eosinofilia ematica e dall'espettorato indotto (4). La discrepanza tra FeNO e infiammazione eosinofila è risultata evidente negli studi con gli agenti biologici (mAb) anti IL-5 e IL-13. Mepolizumab, un mAb anti IL-5, riduce infatti in maniera significativa gli eosinofili ematici e nello sputo, senza influenzare i valori di FeNO; al contrario, Lebrikizumab, un mAb anti IL-13, riduce significativamente i valori di FeNO senza modificare particolarmente gli eosinofili ematici (15).

FeNO nella diagnosi di una infiammazione responsiva ai corticosteroidi inalatori (ICS)

Gli steroidi inalatori, come ricordato da tutte le principali Linee Guida nazionali e internazionali, rappresentano il gold standard nella terapia di fondo dei pazienti asmatici, sia adulti che in età pediatrica, per l'efficace azione antinfiammatoria e l'indiscussa capacità di ridurre il rischio di riacutizzazioni/declino funzionale. In pazienti con infiammazione "Th2-driven", molti studi hanno evidenziato l'efficacia della misurazione del FeNO nel predire la risposta alla terapia cortisonica (sistemica e topica). Soggetti asmatici con elevati valori di FeNO hanno infatti un'alta probabilità di rispondere agli steroidi inalatori, mostrando, nella maggior parte dei casi, una rapida riduzione dei livelli di FeNO dopo l'inizio della terapia (14). Un recente lavoro (16) attribuisce ad elevati valori di FeNO (≥ 35 ppb) un odd ratio di 10.3 per una buona risposta agli ICS. Elevati valori di FeNO si sono inoltre dimostrati in grado di identificare, tra i pazienti con "difficult-to-treat asthma", quelli potenzialmente responsivi ad alte dosi di ICS o CS sistemici (17). Questi dati non devono sorprendere, poiché una persistente infiammazione "Th2-high" è più strettamente correlata alla risposta positiva, sia short che long-term, agli steroidi inalatori rispetto ai sintomi e ai test di funzionalità respiratoria convenzionali (spirometria, test reversibilità, misurazione picco di flusso e test con metacolina). Alti valori di FeNO (> 33 ppb) si sono dimostrati in grado di predire la risposta positiva agli steroidi inalatori anche in una coorte di pazienti con assenza di eosinofilia nell'espettorato, ma con verosimile fenotipo infiammatorio "Th2-high" (18). La metodica appare quindi assai utile nell'identificare e monitorare pazienti asmatici con un'infiammazione delle vie aeree Th2/eosinofila, che può trarre beneficio da terapie anti-infiammatorie, in particolare con steroidi inalatori; tale strategia consente inoltre di evitare, in pazienti con fenotipo infiammatorio verosimilmente non responsivo, l'uso (o l'aumentato dosaggio) di terapie dai potenziali effetti collaterali (8). Questo aspetto è stato stressato nel documento ufficiale ATS precedentemente ricordato (14), dove l'utilizzo del FeNO viene raccomandato per determinare la probabilità di risposta agli steroidi inalatori (raccomandazione "strong" secondo GRADE). Non risulta però agevole stabilire precisi cut off per i valori di FeNO, per i già citati fattori individuali/ambientali (Fig. 2). Il documento ATS (altra raccomandazione "strong") suggerisce però che valori di FeNO > 50 ppb negli adulti e > 35 ppb nei bambini, indicano fortemente la probabile buona risposta, nei soggetti sintomatici, alla terapia con steroidi inalatori; al contrario valori bassi, < 25 ppb negli adulti e < 20 ppb nei bambini, depongono fortemente per un'improbabile buona risposta agli ICS. Il documento suggerisce cautela nell'interpretare i valori intermedi (25-50 ppb adulti, 20-35 ppb bambini), che vanno correlati al contesto clinico del singolo paziente. Negli ultimi due anni, una

serie di lavori hanno però evidenziato che soggetti asmatici con valori intermedi (25-50 ppb), rispondono comunque agli ICS in misura simile a quella dei pazienti con valori alti (19) e analoghe conclusioni emergono dagli studi che hanno valutato i valori intermedi di FeNO in relazione alla risposta a Omalizumab e Lebrikizumab. Ovviamente i cut off vanno abbassati nei pazienti fumatori, anche se occorre ricordare che fumatori asmatici mostrano valori di FeNO più elevati rispetto ai fumatori non asmatici, e che un FeNO elevato predice la risposta agli ICS anche nei fumatori (20).

FeNO nel monitoraggio di una infiammazione responsiva ai corticosteroidi inalatori

Il dosaggio di corticosteroidi inalatori necessario per ottenere il controllo della malattia è variabile da paziente a paziente, e talora sono necessari dosaggi elevati, con aumentato rischio di effetti collaterali. Appare pertanto importante per il clinico ottimizzarne il dosaggio al fine di coniugare adeguato controllo della malattia, riduzione delle riacutizzazioni e ridotti/assenti effetti collaterali della terapia. Negli ultimi 10 anni molti studi hanno valutato l'utilizzo di FeNO, in aggiunta al controllo clinico, nell'ottimizzare la dose di steroidi inalatori (decisione su step-up e step-down), rispetto al solo controllo clinico, valutando come principali indici la riduzione delle riacutizzazioni e il controllo dell'asma. I risultati appaiono decisamente contrastanti: a fronte di studi indubbiamente "positivi" (21), altri non hanno evidenziato alcun beneficio dall'aggiunta del FeNO (22), sia in età adulta che in bambini, e per questo motivo alcuni recenti documenti ufficiali/Linee Guida (ad esempio quelle ERS/ATS sull'asma severo (23) e quelle della Task Force pediatrica ERS (24) concludono che: " FeNO is not recommended at present for adjusting ICS treatment/ routine monitoring of asthma". Vanno però considerati alcuni aspetti importanti, tra i quali il differente disegno dei vari studi e i cut off del FeNO (identificati per decidere step-up e step-down della terapia) non omogenei nei differenti studi. Una recente revisione sistematica che ha valutato alcuni studi, in adulti e in età pediatrica, ha concluso che il numero complessivo di riacutizzazioni non era statisticamente ridotto nel gruppo FeNO (25); questo dato appare però sorprendente, in quanto FeNO è un eccellente biomarker di flogosi Th2, e la principale conseguenza negativa di un'infiammazione Th2-high in pazienti in terapia con ICS è rappresentata da un aumentato rischio di esacerbazioni asmatiche; se però negli studi presi in considerazione dalla meta-analisi viene valutato il tasso di riacutizzazioni piuttosto che il numero complessivo di riacutizzazioni (dato quest'ultimo sicuramente meno "performante" nello stabilire l'impatto di un intervento sul rischio futuro rispetto al tasso di riacutizzazioni o al tempo della prima riacutizzazione, anche perché viene influenzato dalla presenza di pazienti con più riacutizzazioni), risulta evidente una riduzione significativa: 30% negli studi pediatrici e 47% negli adulti (26,27). Recentemente, negli adulti si sono aggiunti i dati di tre studi molto interessanti, il primo dei quali ha valutato un gruppo di donne asmatiche durante la gravidanza, mentre gli altri sono stati condotti nel contesto della Medicina Generale (Svezia e Olanda). Nel primo studio (28), l'utilizzo del FeNO ha significativamente ridotto il numero di riacutizzazioni e i ricoveri per asma (va ricordato che le riacutizzazioni asmatiche durante la gravidanza sono la principale causa di esiti perinatali sfavorevoli, sia materni che fetali). Nel lavoro condotto in un setting di Medicina Generale in Svezia (29), le riacutizzazioni si sono ridotte, nel "gruppo FeNO", del 50%, in aggiunta a un miglior controllo dell'asma. L'ultimo studio (30), olandese, appare molto interessante, in quanto introduce aspetti di "cost-effectiveness": a fronte di un tasso di esacerbazioni simile, il gruppo FeNO evidenzia un miglior controllo dell'asma, un ridotto utilizzo di farmaci e l'intervento appare decisamente "cost-effective". A tale proposito, il documento ufficiale NICE, precedentemente

ricordato (11), conclude che, dopo una dettagliata analisi delle evidenze disponibili, “the use of FeNO measurement for asthma management in adults is likely to be cost-effective”. A inizio 2016, una meta analisi sull’ utilizzo del FeNO nel monitoraggio dell’ asma (31), ha evidenziato una significativa riduzione delle riacutizzazioni di ogni severità. Per quanto riguarda l’ utilizzo del FeNO in età pediatrica, un recente lavoro (32) ha evidenziato un impatto positivo nel ridurre il numero di bambini con riacutizzazioni severe; particolarmente intrigante è il disegno dello studio, in quanto il cut off di FeNO “decisionale” per lo step-up o lo step-down era legato al numero di prick test positivi: FeNO veniva considerato infatti elevato se ≥ 10 ppb in bambini con skin prick test (SPT) negativi, ≥ 12 ppb in con 1 SPT positivo, e ≥ 20 ppb in bambini con ≥ 2 SPT positivi. Questa strategia potrebbe minimizzare l’ effetto confondente dell’ atopia sui valori di FeNO.

FeNO e aderenza terapeutica

Una buona aderenza alla terapia rappresenta ovviamente un requisito essenziale per il raggiungimento del controllo dell’ asma, attuale e futuro. L’ uso del FeNO appare utile nel valutare l’ aderenza del paziente alla terapia con steroidi inalatori, data la rapida e dose-dipendente risposta alla terapia (33). Diversi lavori segnalano una significativa correlazione tra FeNO e compliance; in pazienti con asma di difficile controllo trattati con steroidi inalatori monitorati tramite FeNO, quelli con buona aderenza alla terapia mostrano infatti una significativa maggior riduzione dei valori. Appare pertanto essenziale che, in presenza di elevati valori di FeNO nonostante una terapia antiinfiammatoria apparentemente adeguata, l’ aderenza e la corretta esecuzione della terapia siano attentamente considerate.

FeNO e risposta a terapie non cortisoniche

Gli antileucotrieni riducono le concentrazioni di FeNO nei soggetti asmatici (34), ma alti valori di FeNO suggeriscono una probabile maggior risposta agli steroidi inalatori rispetto al Montelukast (35). Negli ultimi anni l’ avvento delle terapie biologiche rivolte ai fenotipi eosinofilo e Th2-high, ha centrato l’ attenzione sui possibili biomarker di risposta positiva (aspetto di importanza cruciale, dati i costi di queste terapie e la congiuntura economica non favorevole per i Sistemi Sanitari). Hanania et al (36) hanno valutato il ruolo del FeNO basale nel predire l’ efficacia di Omalizumab (mAb anti-IgE) nel ridurre le riacutizzazioni: i pazienti con FeNO basale elevato mostravano una significativa riduzione del tasso di esacerbazioni rispetto ai pazienti con basso FeNO. Per quanto riguarda Lebrikizumab (mAb anti-IL-13), Corren et al (37) hanno osservato un significativo miglioramento della funzione respiratoria in pazienti con alti valori “pre-treatment” di FeNO rispetto ai pazienti con valori bassi. Recentemente è stato anche evidenziato che la riduzione di FeNO dopo Dupilumab (agente biologico anti IL-4/IL-13) si associa a miglioramento del FEV1(38).

FeNO e predizione delle esacerbazioni e del declino funzionale

I dati della letteratura attribuiscono al FeNO un ruolo assai importante quale biomarker di rischio futuro (riacutizzazioni, declino funzionale). Numerosi studi hanno infatti chiaramente evidenziato che, in pazienti in terapia di fondo ed “aderenti”, elevati valori di FeNO predicono la comparsa di riacutizzazioni, e questo è stato recentemente confermato anche in una coorte di pazienti con asma “late-onset” eosinofilo (eosinofili nell’ espettorato $\geq 3\%$, nonostante terapia di fondo secondo linee-guida). Altri lavori hanno inoltre mostrato un ruolo del FeNO nel predire la perdita di controllo e la

comparsa di riacutizzazioni dopo riduzione/stop della terapia con steroidi inalatori (39). Alti valori di FeNO sembrano costituire un fattore di rischio per un maggior declino della funzione respiratoria nel tempo (40).

Conclusioni

Nonostante alcune indiscutibili aree grigie, meritevoli di studi randomizzati e controllati ben disegnati, ma soprattutto di studi nella vita reale che abbiano come outcome la “cost-effectiveness”, l'utilizzo del FeNO nella diagnosi/monitoraggio della eterogenea sindrome asmatica appare associare ideali caratteristiche di non-invasività e semplicità di esecuzione a notevoli doti predittive di buona/cattiva risposta alla terapia (steroidi inalatori/montelukast/mAb-anti-citochine Th-2) e, aspetto decisamente non secondario, a elevata capacità di individuare pazienti ad alto rischio di future esacerbazioni e maggior declino funzionale (39-42).

Bibliografia

1. K. Alving and A. Malinovschi .Basic aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir Mon* 2010. 49, 1–31.
2. F L M Ricciardolo. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003;58:175–182
3. F.L.M. Ricciardolo, P.J. Sterk, B. Gaston et al , Nitric Oxide in Health and Disease of the Respiratory System. *Physiol Rev* 2004 Jul;84(3):731-65.
4. D. Ludviksdottir, Z. Diamant, K. Alving et al. Clinical aspects of using exhaled NO in asthma diagnosis and management. *The Clinical Respiratory Journal* 2012 Oct;6(4):193-207
5. P. J. Barnes, R.A. Dweik, MD, A. F. Gelb et al. Exhaled Nitric Oxide in Pulmonary Diseases *CHEST* 2010 Sep;138(3):682-92.
6. ATS/ERS Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005; vol. 171: 912-930.
7. ERS-ATS Statement. Baraldi E, de Jongste JC; European Respiratory Society; American Thoracic Society. Measurement of exhaled nitric oxide in children, 2001. *Eur Resp J* 2002;20:223-37.
8. FLM Ricciardolo, V Sorbello and G Ciprandi. FeNO as biomarker for asthma phenotyping and management *Allergy Asthma Proc* 2015 Jan-Feb;36(1):e1-8.
9. Global Initiative for Asthma (GINA). Pocket guide for asthma management and prevention, 2014. www.ginasthma.org. Date last accessed: December 24, 2014. Date updated: May 1, 2014
10. S Harnan, M Essat, T Gomersall et al. Exhaled Nitric Oxide For The Diagnosis Of Asthma In Adults And Children: A Systematic Review. *Value Health*. 2015 Nov;18(7):A345
11. NICE. Asthma: diagnosis and monitoring of asthma in adults, children and young people. Clinical guideline, www.nice.org.uk January 2015
12. L. Bjermer , K. Alving , Z. Diamant et al. Current evidence and future research needs for FeNO measurement in respiratory Diseases, *Respiratory Medicine* 2014 ;108(6):830-41.
13. I. D Pavord, Andrew Bush, Stephen Holgate, Asthma diagnosis: addressing the challenges *Lancet Respir Med* 2015 May;3(5):339-41.

14. R. A. Dweik, P. B. Boggs, S. C. Erzurum et al. *An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications.* *Am J Respir Crit Care* 2011 Sep 1;184(5):602-15.
15. Arron JR, Choy DF, Scheerens H, Matthews JG. *Noninvasive biomarkers that predict treatment benefit from biologic therapies in asthma.* *Ann Am Thorac Soc.* 2013 Dec;10 Suppl:S206-13.
16. Cowan DC, Taylor DR, Peterson LE et al. *Biomarker-based asthma phenotypes of corticosteroid response.* *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Apr;135(4):877-83.
17. Pérez-de-Llano LA, Carballeda F, Castro Añón O et al *Exhaled nitric oxide predicts control in patients with difficult-to-treat asthma.* *Eur Respir J.* 2010 Jun;35(6):1221-7.
18. Cowan DC, Cowan JO, Palmay Ret al. *Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma.* *Thorax.* 2010 May;65(5):384-90.
19. Malinovschi A, Van Muylem A, Michiels S et al. *FeNO as a predictor of asthma control improvement after starting inhaled steroid treatment.* *Nitric Oxide.* 2014 Aug 31;40:110-6.
20. Malinovschi A, Backer V, Harving H, Porsbjerg C. *The value of exhaled nitric oxide to identify asthma in smoking patients with asthma-like symptoms.* *Respir Med.* 2012 Jun;106(6):794-801.
21. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP et al. *Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma.* *N Engl J Med.* 2005 May 26;352(21):2163-73.
22. Calhoun WJ1, Ameredes BT, King TS et al. *Comparison of physician-, biomarker-, and symptom-based strategies for adjustment of inhaled corticosteroid therapy in adults with asthma: the BASALT randomized controlled trial.* *JAMA.* 2012 Sep 12;308(10):987-97.
23. K. F. Chung,, S. E. Wenzel, , J. L. Brozek et al. *International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma.* *Eur Respir J* 2014; 43: 343–373.
24. Lødrup Carlsen KC, Pijnenburg MW; *ERS Task Force Monitoring Asthma in Children.* *Monitoring asthma in childhood.* *Eur Respir Rev.* 2015 Jun;24(136):178-86.
25. Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ, et al. *A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils).* *Thorax.* 2012 Mar;67(3):199-208.
26. Donohue JF, Jain N. *Exhaled nitric oxide to predict corticosteroid responsiveness and reduce asthma exacerbation rates.* *Respir Med.* 2013 Jul;107(7):943-52.
27. Mahr TA, Malka J, Spahn JD. *Inflammometry in pediatric asthma: a review of fractional exhaled nitric oxide in clinical practice.* *Allergy Asthma Proc.* 2013 May-Jun;34(3):210-9.
28. Powell H, Murphy VE, Taylor DR, et al. *Management of asthma in pregnancy guided by measurement of fraction of exhaled nitric oxide: a double-blind, randomised controlled trial.* *Lancet.* 2011 Sep 10;378(9795):983-90.
29. Syk J, Malinovschi A, Johansson G et al. *Anti-inflammatory treatment of atopic asthma guided by exhaled nitric oxide: a randomized, controlled trial.* *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2013 Nov-Dec;1(6):639-48.
30. Honkoop PJ, Loijmans RJ, Termeer EH, et al. *Symptom- and fraction of exhaled nitric oxide-driven strategies for asthma control: A cluster-randomized trial in primary care.* *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Mar;135(3):682-8.
31. M. Essat, S.Harnan, T. Gomersall et al. *Fractional exhaled nitric oxide for the management of asthma in adults: a systematic review.* *Eur Respir Rev.* 2016 in press.

32. *Petsky HL, Li AM, Au CT, et al. Management based on exhaled nitric oxide levels adjusted for atopy reduces asthma exacerbations in children: A dual centre randomized controlled trial. Pediatr Pulmonol. 2015 Jun;50(6):535-43.*
33. *McNicholl DM, Stevenson M, McGarvey LP et al. The utility of fractional exhaled nitric oxide suppression in the identification of nonadherence in difficult asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2012 Dec 1;186(11):1102-8.*
34. *Montuschi P, Mondino C, Koch Pet al. Effects of montelukast treatment and withdrawal on fractional exhaled nitric oxide and lung function in children with asthma. Chest. 2007 Dec;132(6):1876-81.*
35. *Rabinovitch N, Graber NJ, Chinchilli VM et al. Urinary leukotriene E4/exhaled nitric oxide ratio and montelukast response in childhood asthma. J Allergy Clin Immunol. 2010 Sep;126(3):545-51.*
36. *Hanania NA, Wenzel S, Rosén K et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. Am J Respir Crit Care Med. 2013 Apr 15;187(8):804-11.*
37. *Corren JI, Lemanske RF, Hanania NA et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. N Engl J Med. 2011 Sep 22;365(12):1088-98.*
38. *Wenzel S, Ford L, Pearlman D, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. N Engl J Med. 2013 Jun 27;368(26):2455-66.*
39. *J.C. de Groot ,M.Amelink ,S. B. de Nijset al. Risk Factors for Frequent Severe Exacerbations in Late-Onset Eosinophilic Asthma . Am J Respir Crit Care 2015 Oct 1;192(7):899-902.*
40. *van Veen IH, Ten Brinke A, Sterk PJ et al. Exhaled nitric oxide predicts lung function decline in difficult-to-treat asthma. Eur Respir J. 2008 Aug;32(2):344-9.*
41. *I.D. Pavord and M. Bafadhel, Exhaled nitric oxide and blood eosinophilia: Independent markers of preventable risk J Allergy Clin Immunol 2013.*
42. *Dweik RA, Sorkness RL, Wenzel S et al. Use of exhaled nitric oxide measurement to identify a reactive, at-risk phenotype among patients with asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2010 May 15;181(10):1033-41.*