

Univerzita Karlova v Praze
3. lékařská fakulta

Disertační práce

Praha, 20. 2. 2015

MUDr. Vladimír Řihák

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Disertační práce

Kondenzát vydechaného vzduchu v diagnostice plicních nemocí

Breath condensate in the diagnostics of lung diseases

Školitel: doc. MUDr. Norbert Pauk, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20. 2. 2015

Vladimír Řihák

Podpis

Děkuji doc. MUDr. Norbertu Paukovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce a za podnětné připomínky. Dále děkuji manželce a dětem za podporu v průběhu celého studia.

Identifikační záznam:

Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

ŘIHÁK, Vladimír. *Kondenzát vydechovaného vzduchu v diagnóze plicních nemocí [Breath condensate in the diagnosis of lung diseases]*. Praha, 2014. Počet stran 65, počet příloh 40. Typ závěrečné práce: Disertační práce.

Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, Klinika pneumologie a hrudní chirurgie Praha Nemocnice na Bulovce. Vedoucí závěrečné práce/Školitel – doc. MUDr. Norbert Pauk, Ph.D.

Klíčová slova: plicní nemoci, kondenzát vydechovaného vzduchu, oxid dusnatý, dusitany, dusičnany, interleukiny, astma bronchiále, chronická obstrukční plicní nemoc, intersticiální plicní nemoci

Key words: lung diseases, breath condensate, nitric oxide, interleukins, asthma bronchiale, chronic obstructive lung disease, interstitial lung disease

SOUHRN

Úvod: Vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu se nabízí jako nová, neinvazivní metoda v diagnostice plicních onemocnění. Bylo popsáno již cca 200 markerů, které byly v kondenzátu verifikovány, některé jsou více, jiné méně rozpracovány. Zlatým standardem je vyšetření vydechovaného oxidu dusnatého a jeho metabolitů. Další markery jsou zkoumány v diagnostice CHOPN či plicních fibrotizujících procesech. Cílem je využít je nejen k diagnostice, ale i monitoringu onemocnění či k preventivním opatřením.

Metody: V průběhu 3 let měsíců bylo na Klinice pneumologie a hrudní chirurgie v Praze Bulovce a na Plicním oddělení Krajské nemocnice Tomáše Bati ve Zlíně vyšetřeno 124 pacientů. Z nich pak byly sestaveny jednotlivé podskupiny: a) zdraví nekuřáci, b) kuřáci bez jakýchkoliv projevů onemocnění dýchacích cest s normálními výsledky funkčního vyšetření plic, c) astmatici se známkami onemocnění nekontrolovaného léčbou, d) astmatici, kteří měli kontrolované onemocnění, e) pacienti s exacerbovanou CHOPN, f) pacienti s CHOPN bez známek exacerbace, g) pacienti s kryptogenní fibrotizující alveolitidou, kteří měli známky aktivity onemocnění, prokázány v BAL i HRCT vyšetřením.

Sběr kondenzátu byl prováděn přístrojem EcoScreen (Jaeger Toennies, SRN) do sběrače s použitím nosní svěrky.

Výsledky: Koncentrace dusičnanů ve skupinách zdravých nekuřáků i kuřáků byly navzájem srovnatelné ($P = 0,47$) a statisticky významně vyšší ($P < 0,01$), než výsledky ve skupinách nemocných osob. Rozdíly mezi ostatními skupinami nebyly nalezeny.

Koncentrace dusitanů u zdravých kuřáků byly o 43 % vyšší než u nekuřáků, nicméně rozdíl nedosáhl statistické významnosti ($P = 0,12$). Koncentrace dusitanů byly vyšší u nemocných s astmatem a exacerbací astmatu ve srovnání se zdravými osobami ($P < 0,05$), ale mezi skupinami nemocných s astmatem a exacerbací astmatu se nelišily. Při analýze zahrnující obě skupiny nemocných s astmatem a zdravé osoby bylo zjištěno, že se koncentrace dusitanů zvyšují s klesající hodnotou FEV1.

Hodnoty koncentrací dusitanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu u nemocných s exacerbací CHOPN byly vyšší než u nemocných bez exacerbace ($P < 0,05$) a u zdravých osob ($P < 0,01$), zatímco nemocní bez exacerbace měli zcela srovnatelné výsledky se zdravými osobami. Korelace mezi koncentracemi dusitanů a FEV1 nedosáhla statistické významnosti ($P = 0,12$). Dusitany v kondenzátu byly v porovnání se zdravými osobami zvýšené i u nemocných s kryptogenní fibrotizující alveolitidou ($P < 0,05$).

Koncentrace IL-1 β byly vyšší než kvantifikační limit 1 pg/ml jen u 9 % subjektů z vyšetřeného souboru. Pro IL-18 bylo 12 % výsledků vyšších než 0,5 pg/ml. Jednalo se ve všech případech o vzorky nemocných osob, v kontrolním souboru byly všechny výsledky pod limity stanovitelnosti. Vzájemné srovnávání skupin nemohlo být provedeno pro malý počet pozitivních nálezů.

Závěr: Dusitany v kondenzátu vydechovaného vzduchu splnily základní charakteristiky markeru využitelného u nemocných s astmatem, CHOPN i KFA. Hodnocení koncentrací dusičnanů bylo ovlivněno falešně zvýšenými koncentracemi z důvodu kontaminace vzorků kondenzátu při odběru. Koncentrace IL-1 β a IL-18 byly použitými ELISA soupravami ve většině vzorků neměřitelné.

SUMMARY

Introduction: Examination of exhaled breath condensate is offered as a new, non-invasive diagnostic method in lung diseases. It has been described about 200 markers, which were verified in the condensate, some more, some less developed. The gold standard of examination is exhaled nitric oxide and its metabolites. Other markers are studied in the diagnosis of COPD or pulmonary fibrotic processes.

The aim is to use them not only for diagnosis, but also for monitoring disease, or preventive measures.

Methods: 124 patients were examined during 3 years at The University Clinics of Pneumology and Thoracic Surgery in Prague Bulovka and the Pulmonary Department of the Regional Hospital of Tomas Bata in Zlín. Among them were assembled sub-groups: a) the health of nonsmokers, b) smokers without any symptoms of respiratory illness with normal lung function tests, c) asthmatics with evidence of uncontrolled disease treatment, d) in asthmatics who had controlled disease, e) patients with exacerbated COPD, f) COPD patients without evidence of exacerbation, g) patients with cryptogenic fibrosing alveolitis, who had signs of disease activity detected in BAL and HRCT examination.

Condensate was collected with the EcoScreen (Jaeger Toennies, Germany).

Results: Nitrate concentrations in groups of healthy non-smokers and smokers were mutually comparable ($P = 0.47$) and significantly higher ($P < 0.01$) than the results in groups of sick people. The differences between the other groups were found.

The concentration of nitrite in healthy smokers were about 43 % higher than in non-smokers, but the difference did not reach statistical significance ($P = 0.12$). The concentration of nitrite were higher in patients with asthma and asthma exacerbations compared with healthy subjects ($P < 0.05$) between the groups of patients with asthma and asthma exacerbations did not differ. When analyzing comprising two groups of patients with asthma and healthy persons, it was found that the nitrite concentration increased with decreasing value FEV₁.

The level of concentration of nitrite in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD was higher than in patients without exacerbation ($P < 0.05$) and healthy subjects ($P < 0.01$), whereas patients without exacerbation had completely comparable results in healthy persons. The correlation between the concentrations of nitrite and FEV₁ did not reach statistical significance ($P = 0.12$). Nitrites in condensate were compared to healthy subjects increased among patients with cryptogenic fibrosing alveolitis ($P < 0.05$). Concentrations of IL-1 β were higher than the quantification limit 1 pg/ml only in 9 % of the subjects examined. For IL-18 was 12 % of the results greater than 0.5 pg/ml. It was in all cases the samples of the patient and the control group were all below the limits of quantification results. Groups comparison could not be performed for a small number of positive findings.

Conclusion: Nitrite in exhaled breath condensate meet the basic characteristics of the useful marker for patients with asthma, COPD and KFA. Rating nitrate concentrations were affected by falsely elevated concentrations due to sample contamination condensate collection. The concentration of IL-1 β and IL-18 ELISA kits were used in the majority of samples measurable.

OBSAH

ÚVOD	9
1 MARKERY V KONDENZÁTU VYDECHOVANÉHO VZDUCHU.....	10
2 ASTMA	20
3 CHOPN.....	36
4 REVMATICKÉ NEMOCI, NEMOCI S POSTIŽENÍM PLICNÍHO INTERSTICIA VE VZTAHU K NO A KONDENZÁTU.....	44
5 CÍL PRÁCE.....	48
6 SOUBOR NEMOCNÝCH A METODY.....	49
7 VÝSLEDKY	51
8 DISKUSE.....	57
ZÁVĚR.....	62
LITERATURA	63
SEZNAM ZKRATEK.....	94
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	96
SEZNAM TABULEK	97

ÚVOD

Vyšetření vydechovaného vzduchu a jeho komponent má dlouhou tradici. Jedněmi z prvních vědců, kteří se touto problematikou zabývali, byli Antoine Laurent de Lavoisier a Pierre Simon de Laplace. Již v roce 1784 prokázali, že při dýchání se spotřebovává kyslík a uvolňuje oxid uhličitý.

Eduard Nebelthau v polovině roku 1800 popsal, že dech diabetiků obsahuje aceton a Francis Edmund Anstie v 1874 izoloval z dechu etanol (což je základem testování alkoholu v dechu dodnes).

Hlavní průlom ve vědeckém studiu vydechovaného vzduchu lze datovat do 70. let 20. století, kdy Linus Pauling prokázal, že vydechovaný vzduch obsahuje více než klasické plyny dusík, kyslík, oxid uhličitý a vodní páry. Na základě výsledků analýz prováděných plynovou chromatografií Linus Pauling ohlásil přítomnost 250 látek ve vydechovaném vzduchu.

Nové poznatky ve zkoumání kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV) byly zveřejněny během kongresu The International Meeting of American Thoracic Society (ATS) v Torontu v Kanadě 4.–10. 5. 2000. Bylo zde publikováno více než třicet zásadních sdělení týkajících se problematiky dechového kondenzátu, z nichž většina pocházela z dílny skupiny kolem Petra Barnse z Londýna. Narůstající zájem o vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu potvrdil také Annual Congress European Respiratory Society (ERS), konaný ve Florencii 30. 8. – 3. 9. 2000.

Pomocí metod moderní hmotnostní spektrometrie (MS) a hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií (GC-MS) nyní můžeme identifikovat více než 1000 unikátních látek ve vydechovaném vzduchu. Tyto látky zahrnují elementární plyny, jako je oxid dusnatý a oxid uhelnatý a množství těkavých organických sloučenin.

Vydechovaný vzduch také obsahuje kapičky aerosolu, nashromážděné v kondenzátu vydechovaného vzduchu, kde jsou rozpuštěny i netěkavé sloučeniny, jako jsou proteiny.

1 MARKERY V KONDENZÁTU VYDECHOVANÉHO VZDUCHU

Vydechovaný oxid dusnatý je produkován v plicích NO syntetázami, které konvertují L- arginin na L- citrulin a NO. Existují tři izoformy NO syntetáz /NOS/, které byly v lidských plicích identifikovány; NOS 1 a 3 jsou závislé na zvýšení intracelulárního vápníku pro aktivaci enzymu, zatímco NOS 2 je na vápníku nezávislá. Pro svou aktivitu vyžadují všechny tři izoformy kyslík, NADPH, FAD, FMN a tetrahydrobiopterinacalmodulin.

Expres NOS 2 v dechových cestách je zodpovědná za zvýšení vydechovaného oxidu dusnatého NO u astmatu. NOS 2 je regulována zánětlivými cytokiny a produkuje poté vysoké hladiny NO.

NO je považován za multifunkční molekulu, která je mediátorem velkého počtu fyziologických procesů ve většině orgánových systémů obratlovců. Tyto procesy ovlivňují relaxaci hladkých svalů, relaxaci endotelu, srážení trombocytů, činnost centrálního a autonomního nervového systému, lýzu tumorózních buněk, likvidaci bakterií apod.

Skupiny enzymů, které produkují NO jako difuzibilní plyn, se souhrnně označují jako syntetázy oxidu dusnatého.

NO je relativně nestabilní a v roztocích dochází k jeho oxidaci na stabilní konečný produkt nitrit nebo nitrát, který pak může být použit jako nepřímý marker k monitoraci NO. Jsou identifikovány tři izoformy NOS, včetně dvou konstitučních (neuronální a endoteliální).

NOS 1 a 3 jsou trvale exprimovány v endoteliích a v neuronálních buňkách, jsou závislé na vápníku a vyžadují calmodulin, který vede k aktivaci enzymu, způsobující pikomolární hladiny NO produkce. V malých hladinách byla NOS 1 nalezena také v příčně pruhovaném svalstvu.

NOS 2 je regulována cestou transkripce mRNA a je exprimována poté, co je buňka vystavena působení specifickými cytokiny a endotoxiny. Oproti izomorfům NOS 1 a NOS 3 nezávisí na vápníku. NOS 2 byla popsána v epitelích, endoteliích, buňkách hladkého svalstva, v makrofázích, fibroblastech a neutrofilech. Expres NOS 2 v různých typech buněk je různá, ale typicky je zvýšená po působení cytokinů jako TNF alfa, IFN gama a interleukin – 1 beta. Expres NOS 2 je snížena kortikoidy transformujícím růstovým faktorem beta /TGF/, destičkovým růstovým faktorem, epidermálním růstovým faktorem, inzulínu podobným růstovým faktorem a trombinem.

Regulace NOS 3 je prostudována méně, ale zřejmě ji zvyšuje parciální tlak kyslíku nebo interferon gama. NOS 1 i 3 jsou zvyšovány estrogény NO produkováný lidskými plicemi lze

detekovat ve vydechovaném vzduchu a v bronchoalveolární lavážní tekutině lidských plic (127). Klíčovou roli sehrává v mnoha fyziologických procesech plic a ovlivňuje patofyziologii mnoha nemocí (34), zejména plicní neurotransmisi, bakterioostázu, relaxaci hladkých svalů cév a dýchacích cest, zánět, mukociliární clearance, sekreci hlenů v dechových cestách a cytotoxicitu (309).

Buněčné zásoby NO v plicích zahrnují epitelální a endotelální buňky plicních artérií a vén, inhibitory nonadrenergických a noncholinergních neuronů, buňky hladkého svalu, mastocyty, mezotelie, fibroblasty, neutrofilů, lymfocyty a makrofágy. V lidských plicích jsou přítomny všechny tři NOS izoformy (249, 152).

Všechny tři syntetázy mají svá specifická umístění; NOS 1 v inhibičních nonadrenergických, noncholinergních neuronech v plicích, NOS 3 v endoteliích a ciliálních epitelálních buňkách, NOS 2 v epitelálních buňkách dechových cest (249, 152).

NOS 2 může být indukována různými typy cytokinů, endotoxinů nebo reaktivních sloučenin kyslíku, je kontinuálně exprimována v normálních epitelích lidských dechových cest (371, 152). NO je volně difuzibilní a vstupuje do pohárkových buněk a zvyšuje produkci guanosycklického monofosfátu /cGMP/, který způsobuje většinu účinků NO (401). NO také proniká do dechových cest a může být měřen v plynné podobě (99). Plicní cirkulace, horní a dolní dýchací cesty a nosní dutiny představují potenciální zásoby i místa tvorby NO (99, 152).

Jaká je dynamika vydechovaného NO u plicních nemocí?

Změny v hladinách NO byly nalezeny u takových plicních nemocí jako astma, plicní hypertenze, bronchiektázie, cystická fibroza a plicní fibrozy (127). Vydechovaný NO je zvýšen u zánětlivých onemocnění dýchacích cest, jako např. astma a infekty horních cest dýchacích, a odráží zvýšení aktivity NOS 2 u epitelálních buněk dýchacích cest (127). Vydechované hladiny NO jsou nižší u kuřáků a jejich snížení je adekvátní k počtu cigaret vykouřených v tentýž den. Cigaretový kouř obsahuje vysoké hladiny NO, které mohou dysregulovat NOS aktivity a spolupodílí se na poškození plic způsobeném kouřením (202). Je doloženo, že pacienti s plicní primární hypertenzí mají nižší primární hladiny exprese NOS 3 v endoteliích plicních cév a nižší hladiny vydechovaného NO (136).

Biosyntéza NO je regulována v buňkách na mnoha úrovních. Je ovlivněna v úrovni genové transkripce NOS, ve fázi exprese proteinů a dimerizace a v kinetice enzymových reakcí. NOS jsou syntetizovány jako monomery a musí být dimerizovány, aby produkovaly NO (401). V dalším postupu syntézy NO dochází k hydroxylaci argininu na hydroxyarginin, který

je poté přeměněn na citrulin. Intracelulární koncentrace argininu přímo ovlivňuje aktivitu NO syntetázy. Intracelulární arginin může být zvýšen syntézou de novo skrze regeneraci citrulinu nebo transportem extracelulárních zásob.

Cesty syntézy argininu a jeho transportní systémy jsou indukovány koordinovaně s NO₂ syntetázovou indukcí v buněčných kulturách. Argininsukcinát syntetáza, což je limitující enzym v syntéze argininu, je indukována endotoxinem spolu s IFN gama a naopak je tlumena kortikoidy.

I když se arginin vyskytuje i v buňkách dechových cest zdravých kontrol, u astmatických epiteliálních buněk dochází k jeho trojnásobnému navýšení. Lze předpokládat, že příčinou tohoto navýšení je koordinovaná indukce cesty syntézy argininu či kationické aminokyselinové transportéry, které způsobují vysoký poměr NO syntézy u astmatiků.

Některé klinické studie ukazují, že se u astmatických pacientů vyskytují zvýšené hodnoty vydechovaného NO, které jsou příčinou redukce plicních funkcí a eosinofilního zánětu. Po podání steroidů dochází ke zlepšení plicních funkcí a zároveň k redukci vydechovaného NO (227). Zvýšení NO, které způsobuje iNOS v dechových cestách, se objevuje nejvíce v bronchiálním epitelu a je spojeno s aktivitou některých zánětlivých buněk. Stimulace odběrů z bronchiálních biopsií, primární kultury epiteliálních buněk nebo epiteliální buněčné linie způsobují indukci iNOS mRNA a iNOS enzymové aktivity.

Zvýšení lokální produkce NO bronchiálním epitelem astmatiků může zvětšit permeabilitu cév nebo mít cytotoxický efekt a spolupodílet se na ztrátě funkce. Zvýšení NO může vést k hyperemii, exudaci plazmy, produkci hlenu a dysbalanci v T buněčné odezvě, která podtrhuje imunologickou basí astmatu.

Zvýšení NO u chronických zánětlivých onemocnění, jež následuje indukci iNOS, může produkovat vasodilataci, vaskulární permeabilitu a otok. NO z iNOS se rovněž spolupodílí na zánětlivé bolesti. Při zvýšení NO a reaktivních produktů tak může dojít ke ztrátě funkce buňky, v některých případech i k buněčné smrti. Selektivní inhibitory iNOS mají uvažovaný potenciál jako protizánětlivá léčba; mohou obnovit buněčné funkce u chronického zánětlivého onemocnění, případně nemoc modifikovat.

Měřením NO ve vydechovaném vzduchu rozumíme hodnocení enzymatické produkce této esenciální mediátorové molekuly v dýchacím systému. Experimentální studie vydechovaného NO ukazují, že enzymatická produkce NO v plicích je konstantní proces, který však může být za určitých podmínek změněn. Zvýšení nebo naopak snížení hladiny vydechovaného NO může způsobit farmakologická léčba či ostatní experimentální manévry (CO, zánět, katecholaminy).

Standardní metoda pro měření vydechaného NO je založena na specifické a senzitivní chemiluminiscenční technice a byla poprvé popsána v roce 1991. Avšak ani tato metoda není zcela přesná, a proto musí být data o vydechaném NO interpretována s maximální opatrností. Pozornost by měla být věnována i fyziologickým faktorům, které mohou ovlivnit měření vydechaného NO a být predispozicí pro chybné závěry.

Díky rychlé oxidaci NO v biologických tkáních je poločas rozpadu pro NO velmi krátký, a proto je jeho měření velmi obtížné. Některé výzkumy používají nepřímá měření produkce NO, např. cGMP, nitritů nebo konverzi citrulinu, což má odrážet efekt tvorby NO či metabolismu NO. V roce 1987 představili vědci zabývající se studiem životního prostředí novou metodu chemiluminiscence, kterou se snažili detekovat oxidy dusíku v atmosféře (96). Tyto metody umožnily přesné měření NO tvořeného buňkami. Během těchto experimentů bylo dokázáno, že NO jako plyn s nízkou rozpustností ve vodném roztoku uniká do dechových cest a může být detekován ve vydechaném vzduchu.

Měření NO ve vydechaném vzduchu neslouží pouze pro přesné studium změny metabolismu NO in vivo, ale může být také vhodnou neinvazivní diagnostickou metodou zánětu dýchacích cest (36). I když bylo o vydechaném NO publikováno přes 600 studií, často se ve svých výsledcích rozcházejí a vedly ke konfliktní interpretaci.

Chemiluminiscenční měření vydechaného NO

Měření NO ve vydechaných plynech chemiluminiscenční reakcí je založeno na faktu, že ozón reagující s NO poskytuje excitovaný NO₂, který emituje foton infračerveného světla. Počet emitovaných fotonů tak přesně odpovídá množství nadbytečných molekul NO, a proto tyto fotony mohou být počítány tzv. fotonásobičem. Protože tímto způsobem mohou reagovat s ozónem emisí světla mnohé další sloučeniny, musíme v metodě použít infračervené filtry, díky kterým měříme pouze světlo s vlnovou délkou kolem 600 nm, typickou pro NO.

Chemiluminiscenční signál v měření NO je redukován vodními parami, oxidem uhličitým a oxidem dusnatým (399).

K výrazně rozdílným výsledkům docházejí studie u měření atmosférické hladiny NO. Zatímco autoři dřívějších prací přicházeli s tvrzením, že vydechaný NO se zvyšuje během dnů s vysokými hladinami NO v okolním vzduchu (29, 394, 73), pozdější studie k těmto závěrům nedospěly (340).

Je prokázáno, že koncentraci NO ve vydechovaném vzduchu ovlivňují ventilační nebo exhalační průtoky a plicní difuzní kapacita NO do krve (**353, 177**). Rovněž bylo potvrzeno, že produkce NO stoupá během těžkého cvičení nebo hyperventilace (**203, 377**).

Jakmile je v jakékoliv tkáni zahájen proces tvorby NO, difunduje tento plyn do všech směrů, kde reaguje s potenciálními cílovými molekulami a je dále metabolizován. NO je lipofilní, má mírnou rozpustnost ve vodných roztocích a molekuly difundují skrze buněčné membrány.

Difuze z místa tvorby se nastává nejvíce tím směrem, kde jsou koncentrace NO nižší. Jestliže by produkce NO a eliminace v respiračních tkáních byly konstantní, nastala by rovnováha koncentrací NO s okolím. Měření NO v respiračním systému nedává díky ventilaci absolutní údaj o tkáňové koncentraci NO, ale odráží pouze její část.

NO je rychle inaktivován hemoglobinem, a proto faktor eliminace NO v dechových cestách a alveolech souvisí s objemem krve v plicní cirkulaci.

U zvířat ovlivňuje koncentraci vydechovaného NO nejen objem, ale i středně těžká plicní arteriální obstrukce. Za fyziologických podmínek změny v plicním průtoku krve neovlivní vydechovaný NO. Extrémní redukce plicního průtoku krve však vede k těžké hypovolemické hemorhagii a zvyšuje koncentraci vydechovaného NO.

Molekulární kyslík představuje substrát pro NOS a dosažitelnost kyslíku je nezbytná pro optimální produkci plicního NO. Akutní hypoxie ukázala pokles vydechovaného NO in vivo v perfundovaných plicích a v plicních endoteliálních buňkách (**162, 390**).

NO a kyslík jsou dva mocné vasodilatátory v plicní cirkulaci. Fakticky NO může zvrátit plicní vasokonstrikci indukovanou nedostatkem O₂ a kyslík může zvrátit plicní vasokonstrikci, indukovanou nedostatkem NO (**344, 132**). Nejvýraznější vasokonstrikce se v plicích objeví, když kyslík a NO nejsou přítomny v celých plicích, jako například u plodu, nebo v některé hypoventilované části plic. Pokud je tlak kyslíku v dechových cestách dostatečně vysoký, aby zajistil oxygenaci (FiO₂ větší než 5 % krve), zůstává zachována i produkce NO.

Za fyziologických podmínek (**300**) oxid dusnatý reguluje cévní rezistenci. Jeho účinky se projeví díky diluci ve vodných biologických roztocích, kterou provází aktivace intracelulární rozpustné guanylátcyklázy a která způsobuje při vysokých pikomolárních koncentracích relaxaci hladkých svalů cév (**90**). Dochází ke zvýšené koncentraci cyklického guanylmonofosfátu.

Změny v rezistenci jsou svázány s inhibicí endotelialního enzymu syntézy NO (eNOS). NO normálně reguluje plicní cévní rezistenci a změny v produkci NO souvisí s onemocněním plicních cév.

Z vodného roztoku z povrchu plicního epitelu přechází NO cestami dýchacími do vydechovaného vzduchu, kde může být měřen (90).

S použitím izolovaných perfundovaných a ventilovaných plic je možné demonstrovat, že během inhibice endotelem tvořeného NO se zvyšuje plicní cévní rezistence a exhalovaná NO koncentrace klesá.

Cirkulující zdroje NO mohou přispívat k exhalovanému oxidu dusnatému. Objem rozpuštěného NO je určován koncentrací plynu ve směsi difundující roztokem, rychlostí průtoku a charakteristikou protékající masy. Mikromolekulární koncentrace NO v plynu udržují nanomolární koncentrace rozpuštěného NO v rovnovážném stavu, zatímco nitrity rychle dosahují makromolekulárních koncentrací v roztocích (90).

Zajímavé je, že nitrity mohou generovat volný NO i za fyziologického pH. To může být zdrojem NO a zároveň důležitou fyziologickou funkcí dopravce NO. Tímto získává NO důležitou roli při ischemickém poškození nebo v chronických zánětlivých onemocněních, jako je např. astma (128).

Ve srovnání se zdravými subjekty pacienti s plicní arteriální hypertenzí a nemocní se ztrátou až 80 % prekapilárních arteriol vydechují výrazně menší koncentraci NO (76).

V plicích získaných od pacientů v případech transplantací je uvolnění endotelem derivovaného NO redukováno v obou izolovaných perfundovaných plicích (77). Imunologické vyšetření na eNOS v histologických studiích potvrzuje redukcii množství enzymu v endotelu v plicích u pacientů s primární plicní hypertenzí. Tyto nálezy dokládají nižší koncentraci vydechovaného NO.

Zásoby vydechovaného NO jsou jiné než plicní cirkulace. Vydechovaný vzduch putuje z alveolů systémem trubic dechových cest k ústům. Pokud je expirační průtok vysoký, jsou zjišťovány nízké koncentrace NO. Vzestup koncentrací NO v nízkých průtocích může být ovlivněn epiteliálním povrchem dechových cest, který se tak stává dalším zdroj NO (410).

U astmatiků epiteliální buňky exprimují inducibilní formu eNOS i za normálních podmínek. Zvýšená exprese NOS způsobuje vyšší koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu. Expozice alergenu zvyšuje vydechování NO a léčba inhalovanými steroidy redukuje vydechované hladiny (46). Tato data poskytují kvantitativní informace o relativních zásobách NO. U astmatiků tak poskytují dechové cesty větší objem vydechovaného NO než zásoby alveolární.

Vydechovaný NO vzniká v epitelu dechových cest. Tato vysoce reaktivní molekula a v krvi se váže na hemoglobin s částečnou oxidací na nitráty. Alveolární kompartment je

konstantně perfundován velkým objemem krve a NO produkovaný v endoteliálních a alveolárních epiteliálních oblastech většinou bude absorbován a inaktivován erytrocyty.

První měření vydechovaného NO u laboratorních zvířat jasně ukázalo, že produkce NO závisí na enzymu v dolním respiračním traktu. Zvířata byla tracheotomizována a vydechovaný NO mohl být detekován po pobytu v cirkulaci, ale ne v přítomnosti inhibitorů NO syntetázy, tedy enzymu odpovědného pro produkci NO.

Další důležitá informace je, že v plicích perfundovaných solným puftrem, kde již krev není přítomna, je ihned více než dvojnásobný vzestup koncentrace vydechovaného NO (332), (75). Ve vysokých pikomolárních koncentracích způsobuje relaxaci hladkých svalů cév (90) (332) (75).

V případě měření vydechovaného NO přímo u úst lidí lze předpokládat, že se jedná o směs NO z dolních dechových cest a NO z dusitanů obsažených ve slinách a regurgitací ze žaludku (444, 279). Podíl z jednotlivých částí závisí na technice měření, speciálně na proceduře sběru vydechovaného vzduchu. Kontinuální sběr vydechovaného NO ústy může obsahovat až 90 % NO produkovaného z nosu (276), a to díky zpětné difuzi z nosu (237), zatímco ústy vydechovaný vzduch v případě jednoduchého měření během fáze plateau není ovlivňován NO z nosních dechových cest. Studie provedené na pacientech vyšetřovaných během bronchoskopie (292) přinesly srovnatelné hodnoty NO z dolních dýchacích cest. K nižší exkreci v dolních dechových cestách je přidána variabilní ústní neenzymatická produkce (322).

Přesto je hlavní typ buněk produkujících molekuly NO detekované ve vydechovaném NO z dolních dýchacích cest stále nejasný. Byly sbírány rozdílné objemy plynů mrtvého prostoru zobrazující plyn z trachey, bronchů, průdušek, průdušinek a analyzovány na vydechovaný NO a ukazují signifikantní podíl distálních dechových cest (94, 97). Velmi nízké koncentrace jsou přítomné v alveolárním plynu in vivo (97, 380), protože dochází k rychlé vazbě NO na nosič – erytrocyt v plicních kapilárách (353) v plicích perfundovaných solným puftrem. Koncové koncentrace NO v krvi jsou velmi vysoké (332, 145, 74), pravděpodobně odrážejí alveolární (makrofágovou nebo endoteliální) produkci a vždy se rychle vážou na hemoglobin.

Infuze acetylcholinu, která masivně stimuluje endoteliální produkci NO, vede jen k hraničnímu zvýšení NO v kondenzátu, což dokazuje, že se NO z alveolárních regionů příliš nepodílí na vydechovaném NO in vivo (nepublikované pozorování). Absence krve (hemoglobin) v plicní cirkulaci během perfuze roztoku se solným puftrem acetylcholinové infuze zvyšují koncentrace vydechovaného NO.

NO je tvořen cestou NOS enzymů – syntetáz NO. Dva z těchto enzymů jsou konstitučně vyjádřeny a jsou aktivovány malým vzestupem intracelulární koncentrace vápníku, druhotně buněčnou aktivací. Neuronální NOS (NOS 1) je především exprimována v neuronech a endoteliální NOS (NOS 3) hlavně v endoteliálních buňkách, ačkoliv ostatní buněčné typy také exprimují obě tyto isoformy. Třetí enzym je indukibilní NOS 2, má mnohem větší hladinu aktivity a je nezávislý na koncentraci vápníku. NOS 2 může být indukován zánětlivými cytokiny, endotoxinem a virovou infekcí, a může ukázat zvýšenou expresi u zánětlivých onemocnění (**34, 127, 39**).

Dosud nejsou jasné buněčné zásoby oxidu dusnatého v dolních dechových cestách. Studie s perfundovanými plicemi předpokládají, že vydechovaný NO se spíše tvoří v alveolárním povrchu než v plicní cirkulaci (**75**) a může být produkován z NOS 3 exprimované v alveolárních stěnách normálních plic. Studie u ventilovaných a perfundovaných plic morčat ukazují, že vydechovaný NO je redukován během perfuze roztokem bez kalcia, což předpokládá, že NO je tvořen konstituční NOS, která je kalcium dependentní. Buňky epitelů dechových cest mohou exprimovat obě NOS, NOS 1 i NOS 3, a tak se mohou podílet na tvorbě NO v dolních dechových cestách (**376, 285**). Zde je i exprese NOS 2, dokonce v buňkách epitelu dechových cest u normálních subjektů (**227, 37**), a NOS 2 se jeví jako důležitá izoforma, která se spolupodílí na vydechovaném NO u zdravých myší (**395**).

U zánětlivých onemocnění právě zvýšení množství exhalovaného NO odráží indukci NOS 2 jako reakci na zánětlivé signály, např. na proinflamatorní cytokiny. Ke zvýšení aktivity NOS došlo v plicní tkáni u pacientů s astmatem, cystickou fibrozou a obliterující bronchitidou (**45**). U astmatických pacientů bylo nalezeno jednoznačně zvýšení exprese NOS 2 v epitelích dechových cest (**164**).

Prozánětlivé cytokiny indukují expresi NOS 2 v kulturách lidských epitelálních buněk (**21**) a zřejmě tytéž cytokiny hrají roli u astmatického zánětu. Enzym NOS 2 může být exprimován i u ostatních buněk, jako jsou alveolární makrofágy, eosinofily a ostatní zánětlivé buňky (**369**).

Předpokládá se, že zvýšení vydechovaného NO je způsobeno zvýšenou expresí NOS 2, protože kortikosteroidy inhibují zánětlivou indukci NOS 2 v epitelálních buňkách (**155**) (**354**), tím vedou ke snížení exprese v bronchiálních biopsiích astmatických pacientů a také redukovat vydechovanou koncentraci NO u astmatických pacientů (**229**).

Jaké jsou neenzymatické zásoby NO? NOS netvoří jen samy zásobu NO ve vydechovaném vzduchu a vydechovaný NO není přesné měření NOS aktivity v dolních dechových

cestách. NO reaguje s molekulami obsahujícími thioly, takovými jako cystein a glutathion, které pak formují S nitroso proteiny a S-nitrosothioly. Odhadem 70–90 % NO je uvolněno z S-nitrosothiolů, které jsou brány jako hlavní zásoba NO v tkáních **(378)**. S nitrosothioly jsou potenciální relaxancia v lidských dechových cestách a mohou hrát důležitou roli při uvolňování a transportu NO na místo jeho aktivit **(391)**.

NO ve vydechaném vzduchu může být také produkován z nitritů, z formování kyseliny dusičné, která tvoří plyn NO s acidifikací **(246)**. Tato cesta, závislá na pH, byla ozřejmena u akutního astmatu, kdy je pH vydechaného kondenzátu nízké **(121)**.

NO je produkován podél průběhu celé délky dýchacích cest. Dechové cesty sekretují NO do lumen, kde se během exhalace míchá s NO z alveolů, a dávají tak společně měřenou vydechanou koncentraci NO. Hladiny NO dodávané horními dechovými cestami (200–1000 ppb) **(243, 30)** a z paranasálních dutin (200–1000 ppb) **(275, 30)** jsou stokrát vyšší než vydechaný NO v dolních dechových cestách (1–9 ppb) **(243, 30)**. Na koncentraci vysokých nosních hladin NO se spolupodílí mnohé faktory. Vedlejší nosní dutiny produkují vysokou hladinu NO **(277)**, zde je zásadní inervace s NOS 1 imunoreaktivními nervovými vlákny podél nosních krevních cév **(250)**.

NO v dolním respiračním traktu je také smíšeného původu a může být z dechových cest, alveolárních epitelálních cest, které exprimují NOS 3 i NOS 1. Podíl endoteliálního NO je minimální a vydechané NOS inhibitory jsou schopné redukovat vydechaný NOS ze 40 % **(373)** bez nějakého efektu na systémovou cirkulaci.

Fibroskopická vyšetření ukazují u normálních subjektů podobné hladiny NO v průdušnici a hlavních bronších. NO je tvořen v dolních dýchacích cestách **(243) (292)** – vydechaný NO je spíše epitelálního než endoteliálního původu a většina NO je více derivována z dechových cest než z alveolů.

Hladiny vydechaného NO může ovlivnit výdechový průtok, uzavírání měkkého patra a vzduch v mrtvém dechovém prostoru. Vydechaný a nosní NO u zdravých subjektů je nezávislý na věku, pohlaví a plicních funkcích **(236)**.

Třebaže měření vydechaného NO je u normálních subjektů vysoce reprodučibilní, pro signifikantní diurnální variace prozatím nemáme žádný důkaz.

Existuje několik závažných faktorů, které mohou měnit hladiny NO u normálních subjektů. Vydechaný NO ovlivňují třeba i rozdílné fáze menstruačního cyklu **(222)**.

Také některé rutinně prováděné testy mohou při opakování redukovat vydechovaný NO, např. opakované spirometrie **(92)** či fyzická námaha **(339)**. Zatímco faktory životního prostředí (např. ozon dioxid chloridu) hladiny vydechovaného NO zvyšují, habituální faktory (kouření a alkohol) vydechovaný NO redukují **(223)**. Infekty HCD signifikantně zvyšují vydechovaný NO a nosní NO **(242)**.

2 ASTMA

Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, charakterizované infiltrací eosinofilů, aktivací T pomocných 2 buněk a aktivací mastocytů. Strukturální buňky dechových cest, včetně epitelii a buněk hladkých svalů se podílí na zánětlivém procesu produkci různých mediátorů včetně oxidu dusnatého. Mnohé zánětlivé mediátory, včetně cytokinů a chemokinů, hrají důležitou roli v astmatu a vedou k charakteristickým projevům, jako je kontrakce hladkých svalů a exsudace plazmy, sekrece hlenu a aktivace senzitivních nervů. Chronický zánět pak vede ke strukturálním změnám včetně proliferace hladkých svalových buněk, formaci nových cév a fibroze, která může vést k ireverzibilním změnám v dechových cestách.

Astma je komplexní nemoc zahrnující mnoho odlišných zánětlivých buněk, mnohé mediátory a celý soubor akutních a chronických reakcí v dechových cestách. K výraznému pokroku došlo v poznání molekulárních a buněčných patofyziologických cest, částečně i díky vývoji nových molekulárních technik a částečně i s využitím nových inhibitorů vyrobených farmaceutickým průmyslem (38).

Chronický zánět je u astmatu základem klinického syndromu.

Dříve byla za základní patofyziologický moment astmatu považována bronchiální hyperreaktivita, způsobující variabilní obstrukci dechových cest a společné symptomy intermitentních pískotů a krátkého dechu. Studie dechových cest astmatických pacientů neukázaly žádný zásadní důkaz o zvýšené kontraktibilitě ke spasmogenům jako histamin in vitro. Lze tedy předpokládat, že hladké svaly v dechových cestách astmatiků nejsou abnormální, ale že abnormální je kontrola průsvitu dechových cest.

U všech pacientů se symptomatickým astmatem se vyskytuje zánět v dechových cestách. Toto bylo opakovaně potvrzeno bronchiálními biopsiemi, bronchoalveolární laváží, indukovaným sputem a s použitím vydechovaných markerů zánětu, jako vydechovaný např. oxid dusnatý či jeho metabolity. Tento zánět zahrnuje všechny dechové cesty u astmatu, z trachey až k terminálním bronchiolům, ale nerozšiřuje se na plicní parenchym. Podíl zánětu u astmatu je charakteristický zvýšením aktivovaných eosinofilů, degranulací mastocytů a aktivací T pomocných buněk (CD 4), tím se částečně odlišuje od zánětu chronické obstrukční plicní nemoci a chronické bronchitidy.

Vztah mezi zánětem a klinickou symptomatologií astmatu ještě není zcela jasně prozkoumán a vysvětlen. Zánět dechových cest je hodnocen ve vztahu k hyperreaktivitě dechových

cest, která se dá měřit provokací histaminem nebo metacholinem, ale stupeň zánětu přesně nekoresponduje s tíží astmatu. Lze předpokládat, že ve stěně dechových cest jsou velmi důležité další faktory, např. její strukturální změny. Zvýšení reaktivity dechových cest je fyziologická abnormalita, která se objevuje dokonce i tehdy, když je funkce dechových cest v normě. Hyperreaktivita dechových cest může vést k zvýšení uvolnění řady látek (histamin, leukotrieny z mastocytů) k abnormálnímu chování hladkých svalů dechových cest, ztlustění stěny dechových cest, edému a ireverzibilnímu ztlustění z hypertrofie hladkých svalů s fibrozou. Senzitivní nervy dechových cest se mohou také spolupodílet na symptomech jako kašel a tlaky na hrudi, protože nervy jsou senzitivizovány chronickým zánětem v dechových cestách.

Ačkoliv většina pozornosti byla dříve zaměřena na akutní zánětlivé změny pozorované v astmatických dechových cestách (bronchokonstrikce, exudace plazmy, sekrece hlenu), astma je chronické zánětlivé onemocnění se zánětem přetrvávajícím mnoho let.

Důležité na tomto chronickém zánětlivém stavu jsou jeho akutní zánětlivé epizody, které korespondují s exacerbacemi astmatu.

Na astmatu se podílí mnoho odlišných zánětlivých buněk, ačkoliv přesné role všech buněčných typu dosud nejsou jasné. Důležité jsou vzájemné interakce mezi těmito buňkami. Ve všech formách astmatu převažují buňky aktivovaných eosinofilů, mastocytů a T helper buněk. U běžného astmatu existuje identický zánět bez atopie (**189**).

Další důležité buňky, mastocyty jsou důležité v zahajování akutní bronchokonstrikční odezvy k alergenu a pravděpodobně i k ostatním nepřímým stimulům, takovým jako cvičení a hyperventilace (cestou osmolarity nebo termálních změn). Mastocyty také sekretují cytokiny, jako IL 4, které mohou být zahrnuty do alergické reakce. Role mastocytů v chronickém zánětu však ještě není zcela jasná. Jsou aktivovány alergenem, a to mechanismem závislým na IgE. Význam IgE v patofyziologii astmatu potvrzují studie, které zkoumají humanizované anti IgE protilátky blokující IgE mediované efekty (4). Anti IgE protilátky se odrážejí v redukci cirkulujícího IgE.

Makrofágy, které pocházejí z krevních monocytů, přecházejí u astmatu do dechových cest. Aktivují se alergenem cestou nízko afinního IgE receptoru a mohou být také inhibovány anti IgE terapií. Enormní repertoár makrofágů umožní těmto buňkám produkovat mnoho odlišných produktů, včetně širokého rozsahu cytokinů, které mohou způsobit zánětlivou odezvu. Makrofágy mají schopnost částečně iniciovat typ zánětlivé odezvy cestou vypuštění určitého vzoru zánětlivých mediátorů. V závislosti na stimulu mohou makrofágy jak zvyšovat, tak

i snižovat intenzitu zánětu. Na funkce lymfocytů mají alveolární makrofágy supresivní efekt, ale to může zhoršit astma po alergenové expozici. Makrofágy mohou být rovněž antigenem prezentující buňky, které připraví alergen k prezentaci T lymfocytům, ačkoliv alveolární makrofágy jsou daleko méně efektivní v této činnosti než makrofágy z jiných míst, např. z peritonea.

Dendritické buňky se vyskytují v epitelu dechových cest, mají podobné vlastnosti jako makrofágy a mohou hrát velmi důležitou roli v iniciaci alergen indukované odpovědi u astmatu. Dendritické buňky naváží alergeny, přetvoří je na peptidy a migrují do lokálních lymfatických uzlin, kde prezentují alergenní peptidy neimunokompromitovaným T lymfocytům k naprogramování produkce alergen specifických T buněk.

Eosinofilní infiltrace představuje charakteristický rys astmatických dechových cest a odlišuje astma od ostatních zánětlivých procesů dechových cest. Inhalace alergenu vede k hraničnímu zvýšení eosinofilů v bronchoalveolární laváži. Mezi počtem eosinofilů v periferní krvi nebo bronchoalveolární laváži a bronchiální hyperreaktivitou existuje určitý stupeň korelace. Uvolněním basálních proteinů a kyslíkových volných radikálů přispívají eosinofily k rozvoji bronchiální hyperreaktivitu. Eosinofily jsou derivovány z prekursorů kostní dřeně a jejich produkce je závislá na cytokinu IL 5. Po alergenové expozici se eosinofily objeví v BAL tekutině, pak dochází k poklesu počtu eosinofilů v periférii a k vyplavení eosinofilních předchůdců do cirkulace. Signálem pro zvýšení eosinofilní produkce je zánět v dechových cestách. Vycestování eosinofilů zpočátku zahrnuje jejich adhezi na endotelie v cirkulaci dechových cest, jejich migraci do submukózy a jejich postupnou aktivaci.

Role neutrofilů v astmatu je méně jasná. Neutrofilly byly nalezeny v dechových cestách pacientů s CHOPN a cystickou fibrozou, které nemají stupeň bronchiální hyperreaktivitu. Objevují se také v dechových cestách pacientů s chronickým astmatem a ve velkém množství se vyskytují i v dechových cestách pacientů, kteří na astma náhle zemřeli. Zvýšený počet neutrofilů se také nalézají v indukovaném sputu z dechových cest těžkých astmatiků. Zatím nevíme, zda jsou tyto buňky přítomny díky vysokým dávkám inhalovaných steroidů, nebo přispívají k patofyziologii těžkého astmatu. Díky uvolnění specifických cytokinů hrají T lymfocyty stěžejní roli v zánětlivé odpovědi u astmatu. Následně dojde k migraci eosinofilů a k výskytu mastocytů v dechových cestách.

T lymfocyty mají za úkol expresi a rozpoznávání množství cytokinů, jako jsou IL 4, 5 a IL 9.

Rovnováhu mezi buňkami Th 1 a Th 2 mohou ovlivňovat uvolněné cytokiny (IL 12), odvozené z dendritických buněk a makrofágů, které upravují rovnováhu ve prospěch Th 1 buněk

a IL 4, který směřuje k Th 2 buňkám. Časná infekce může vyvolávat Th 1 mediovanou odpověď a infekce v dětství spolu s atopickými nemocemi mohou spouštět Th 2 odpověď (185).

Protože dříve bylo obtížné detekovat basofily imunocytochemicky, zůstává jejich role u astmatu stále nejasná. S použitím specifického markeru bylo v dechových cestách astmatických pacientů dokumentováno malé zvýšení basofilů, jejichž počet se ještě zvětšil po alergické expozici. Tyto buňky byly převýšeny eosinofily.

Strukturální buňky dechových cest, včetně epitelů, fibroblastů a hladkých svalů dechových cest, představují důležitý zdroj zánětlivých mediátorů, podobně jako cytokiny a lipidové mediátory u astmatu. Protože strukturální buňky svým počtem výrazně převyšují počty zánětlivých buněk, mohou být hlavní zásobou mediátorů, řídících chronický zánět v astmatických dýchacích cestách. Epiteliální buňky mají navíc klíčovou roli v přepisu inhalovaných environmentálních signálů do zánětlivé odpovědi dechových cest a jsou pravděpodobně cílovými buňkami pro inhalované kortikoidy.

Zánětlivé mediátory

Do patogeneze astmatu se zapojuje mnoho různých mediátorů, které působí na dechové cesty a společně pak předkládají patologický obraz astmatu (35).

Mediátory jako histamin, prostaglandiny, leukotrieny, bradykininy a endoteliny způsobují kontrakci hladkých svalů dechových cest, zvyšují mikrovaskulární propustnost, sekreci hlenu v dechových cestách a ovlivňují ostatní zánětlivé cesty.

Cysteinylvé leukotrieny LTC₄, LTD₄ a LTE₄ představují silné konstriktory lidských dechových cest, zvyšují bronchiální hyperreaktivitu a hrají důležitou roli v astmatu. Rozvoj účinných antileukotrienů nyní zvýšil možnost hodnotit roli těchto mediátorů v astmatu. Účinní LTD₄ antagonisté redukuje námahou a alergenem indukovanou bronchokonstrikci a chronická léčba zlepšuje plicní funkce i symptomy u astmatických pacientů, ačkoliv stupeň zlepšení není až tak velký, jako je vidět u inhalačních kortikosteroidů.

Cytokiny jsou důležité v chronickém zánětu astmatu a hrají kritickou roli v řízení povahy alergické zánětlivé odpovědi (199). Mnohé zánětlivé buňky (makrofágy, mastocyty, lymfocyty) jsou schopné syntetizovat a uvolňovat tyto proteiny a strukturální buňky jako epitelie dechových cest. Buňky hladké svaloviny a endotelie mohou také uvolňovat řadu cytokinů a mohou participovat v chronické zánětlivé odpovědi. Zatímco zánětlivé mediátory jako histamin a leukotrieny jsou důležité v akutní a subakutní odpovědi a v exacerbacích astmatu, cytokiny hrají dominantní roli v chronickém zánětu.

Cytokiny, které jsou důležité v astmatu včetně lymfokinů tvořených Th 2 buňkami: IL 4, který je klíčový v přesmyku B lymfocytů k produkci IgE, pro expresi VCAM 1 na endoteliálních buňkách a pro indukci diferenciaci Th 2 buněk IL 13, který hraje podobně pro IL 4 na IgE přesmyk a IL 5, který je důležitý pro diferenciaci eosinofilů. Výsadní pozice IL 5 v eosinofilii potvrdilo použití IL 5 protilátek u astmatických pacientů.

Další Th 2 cytokin IL 9 může hrát klíčovou roli v zcitlivění odezvy na cytokiny IL 4 a IL 5.

Ostatní cytokiny (IL 1 beta a tumor nekrosis faktor alfa) hrají důležitou roli v amplifikaci zánětlivé odpovědi u astmatu a jsou uvolňovány z řady buněk, včetně makrofágů a epiteliálních buněk.

Oxidativní stres

Podobně jako u všech zánětlivých nemocí je i u astmatu zvýšen oxidativní stres a aktivuje zánětlivé buňky jako makrofágy a eosinofily k produkci reaktivních kyslíkových sloučenin. Důkaz pro zvýšení oxidativního stresu u astmatu je potvrzen zvýšením koncentrací 8- isoprostanů (produktů oxidované kyseliny arachidonové) a peroxidu vodíku (227) ve vydechovaném vzduchu astmatických pacientů. Zvýšení oxidativního stresu závisí na tíži nemoci, může zmnožit zánětlivou odpověď a redukovat odezvu na kortikoidy.

Oxid dusnatý

NO je produkován různými buňkami v dechových cestách syntetázami NO. Inducibilní forma enzymu (iNOS) je produkována v epiteliálních buňkách astmatických pacientů a může být indukována cytokiny v buňkách dechových cest in vitro. Toto může přispět pro zvýšení koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu u neléčených astmatických pacientů (227). Samotný NO je výrazný vazodilatátor a to může zvýšit exudaci plazmy do dechových cest a může také zmnožit Th 2 lymfocyty mediovanou odpověď a zesílit a prolongovat přežití eosinofilů. Kombinace zvýšeného oxidativního stresu a NO může vést k formaci aktivních radikálů peroxynitritu, které mohou být výsledkem nitrosylace proteinů v dechových cestách.

Chronická zánětlivá odpověď má několik efektů na cílové buňky dechových cest, které se odrážejí v charakteristických patofyziologických změnách spojených s astmatem.

Zánět dechových cest

Astma charakterizuje zánět v dechových cestách. Předchozí guidelines pro astma obhajovaly terapie, které se snažily léčit zánět u astmatu inhalací steroidů. Astmatický zánět je tradičně spojován s Th 2 lymfocytárními cytokiny jako IL 4. Interferon gama (Th 1 cytokin) vede k hyperreaktivitě u astmatu (173, 62, 167).

Viry také způsobují zánět v dechových cestách a jsou častou příčinou exacerbace astmatu. NOS 2 je indukována v epitelu dechových cest respiračními viry, včetně chřipky, parainfluenzy, RS viry aj.

Virus chřipky způsobuje výraznou morbiditu a mortalitu v lidské populaci. Jeho klinická odezva je rozdílná, od symptomatické infekce přes rýmy až k virové pneumonii. Ačkoliv jsou faktory určující tíži virové nemoci komplexní, interakce mezi inherentními virovými částicemi a hostitelovou buněčnou odpovědí určuje průběh a závěr nemoci. K prvnímu kontaktu viru s hostitelem dochází v epitelu dechových cest, který je zároveň hlavním cílem infekce. Epiteliální buňky v mukozním povrchu dechových cest mají řadu zánětlivých a imunitních obranných mechanismů jak bojovat s virem, včetně exprese cytokinů s chemoaktivními a prozánětlivými funkcemi (404, 169).

NO produkovaný NOS 2 má zřetelnou antivirovou aktivitu proti řadě virů (219), díky toxickým reaktivním dusíkovým mezisloučeninám se však také spolupodílí na zánětu a poškození dechových cest (404, 11).

Jaká je reakce oxidu dusnatého v astmatických dechových cestách?

Dynamika metabolismu NO během astmatické odpovědi předpokládá multifunkční roli NO v dýchacích cestách. U všech astmatiků se během deseti minut po antigenem indukované astmatické odpovědi dusičnany zvyšují hraničně, kdežto dusitany nebo nitrosothioly se nemění, dokonce ani nejeví tendence ke snížení. Po 48 hodinách po antigenem indukované astmatické odpovědi jsou všechny tři složky zřetelně zvýšené. Na základě těchto pozorování lze konstatovat, že NO může mít poškozující efekt, ale má také protektivní roli v astmatické odpovědi.

Oproti exhalátu nekuřáků obsahuje vydechaný vzduch u astmatiků vyšší hladiny NO (333).

I když není role NO u astmatu zcela jasná, lze předpokládat, že NO relaxuje bronchiální hladké svalstvo a vede tak k bronchodilataci. Rovněž inhibuje prozánětlivé signály (371)

a podílí se na zánětu dechových cest, které poškozují skrze formaci toxických reaktivních sloučenin dusíku (**421**). Působení NO jako molekuly je závislé na jeho koncentraci a spojení s ostatními biomolekulami a proteiny (**102**). NO je vysoce reaktivní molekula a vydechovaný NO reprezentuje jenom frakci totálního objemu NO v plicích. NO reaguje s kyslíkem nebo reaktivními kyslíkovými sloučeninami a formuje oxidativní produkty jako dusitany, dusičnany aj. (**371**).

NO nebo reaktivní nitrosloučeniny (RNS) mohou vést k nitraci tyrozinových zbytků v proteinech, nebo nitrosylaci s výsledkem formování S nitrosothiolů (SNO). Všechny reakční produkty NO jsou přítomny v plicních tekutinách (**371**).

Expozice alergenům dechových cest byla použita jako experimentální model studie mechanismu mediátorů, které vedly k astmatické reakci a zánětu v dechových cestách. Expozice astmatiků vyhrazeným antigenům se odráží v okamžité astmatické odpovědi přicházející během minut a podobně v prolongované pozdní odpovědi.

Okamžitá odezva je spojena s uvolněním bronchokonstrikčních mediátorů a ROS, pozdní odezva se ztluštěním mukosy dechových cest edémem a influxem zánětlivých buněk.

Jaká je hladina NO a jak se mění metabolitové hladiny NO před antigenovou expozicí a po ní?

Plicní hladiny NO v plynové fázi dosáhnou stadia steady state. Základní hladina NO u astmatiků je vyšší než u kontrol. Za deset minut po antigenové stimulaci je hladina NO u obou pozorovaných skupin přibližně stejná, i když u astmatických subjektů má malou tendenci ke zvýšení. Za 48 hodin po antigenové stimulaci se u astmatiků intraplicní NO zvyšuje dvakrát, kdežto u kontrol k takovému zvýšení nedochází.

Dusitany, dusičnany a nitrosothioly v tekutině BAL

Reaktivní dusíkaté produkty se u astmatiků také zvyšují, ale ne u kontrol po stimulaci alergenem. Hlavním produktem NO u zdravých osob jsou dusitany, zatímco dusičnany jsou predominantní v BAL u astmatiků. Dusičnany v BAL u astmatiků stoupají během deseti minut po stimulaci alergenem. Jejich hodnoty se v průběhu 48 hodin ještě výrazně zvýší, ale po této době se už k výrazné změně nedochází (**101**).

Klíčový rozdíl mezi astmatiky a kontrolou je, že NO u astmatických plic je vyšší než u kontrol v basálním stavu a zvyšuje se během několika minut po expozici alergenu.

Při znalostech chemie NO a reakcích tohoto plynu v dolních dechových cestách u pacientů astmatiků (65) můžeme konstruovat model dějů v astmatických dechových cestách a prozkoumat patofyziologické cesty, které mohou přispět k dějům s NO₃ u astmatiků.

V plicích dusičnany reagují s oxyhemoglobinem. Ačkoliv je koncentrace oxyhemoglobinu u zdravých vyšetřovaných dobrovolníků a dobře kontrolovaných astmatiků stejná, může dojít u astmatických plic v klidovém stavu ke zvýšené tvorbě dusičnanů (153).

Zvýšení NO během okamžité astmatické odpovědi dokazuje, že tato patofyziologická cesta není původcem rychlého vzestupu dusičnanů.

Jak vznikají dusitany?

Reakce NO a O₂ je relativně velmi pomalá ve srovnání s rychlou spotřebou NO superoxidem (79). Některé frakce NO in vivo reagují s molekulárním kyslíkem a transformují se na dusitany. Zatímco dusičnany mohou vznikat z dimerizace dusitanů k dosažení N₂O₄ následované nitridací vody s cílem poskytnutí NO₂⁻ a NO₃⁻, není to pravděpodobná cesta v biologických systémech, protože dusitany jsou formovány pomalu v koncentracích NO, zjištěných in vivo (101).

SNO a NO

Zatímco četné studie ukázaly, že lidé s těžkým astmatem mají v dolních dechových cestách přítomny nitrosothioly (SNO) (194), teprve ojedinele bylo doloženo, že SNO se nenachází v dechových cestách lehkých astmatiků, kteří jsou dobře kontrolováni. Nízké hladiny SNO u astmatiků byly dokladem zvýšení katabolických procesů (111).

U neutrofilů existují enzymatické procesy umožňující katabolismus nitrosothiolů (111), ovšem neutrofilové jsou v procentuálním zastoupení u astmatiků pod 1 % buněk, u zdravých kontrol rovněž tak a nezvyšují se signifikantně v 10 minutách po atace alergenu (436). Lze tedy zatím pouze předpokládat, že katabolismus SNO je akcelerován i v stabilním lehkém astmatu, jako je potvrzen v těžkém astmatu. Zajímavé je, že SNO se upravuje k normálu až během pozdní astmatické odpovědi. SNO mohou být formovány v plicích organickými i anorganickými reakcemi. NO, přítomný ve vysokých hladinách v astmatických cestách (153), se může spolupodílet na vzniku SNO za podmínek dostatku glutathionu (371). Peroxynitrity pak mohou být nosičem vysokých thiolových koncentrací (382).

Reakce mezi kyslíkem, superoxidem a NO mohou také formovat v prostředí astmatických dýchacích cest nitridující sloučeniny. Patofyziologické procesy ovlivňující tvorbu SNO, jsou závislé na kyslíku a jejich formace jde cestou tzv. thiolové autooxidace (126). Avšak fakt, že zvýšení SNO je až během pozdní astmatické odezvy a ne v akutní odezvě, zdůvodňuje mechanismus tvorby těchto sloučenin, která zřejmě může záviset na aktivaci zánětlivých buněk, anebo enzymatických procesů, např. činností peroxidáz (436). Přes to všechno tyto nálezy podporují, že přicházející zánět reguluje katabolismus SNO v lehkém astmatu, ale že tvorba SNO je ovlivněna katabolismem v pozdní astmatické odpovědi.

Koncentrace NO tedy stoupá během pozdní astmatické odpovědi (296). NO je endogenně produkován v plicích syntetázami NO (153). Ze tří enzymů NOS 2 exprese je regulována primárně cytokiny. Tak zesílení genové exprese NOS 2 v buňkách epitelu dýchacích cest se objevuje od 8 do 24 hodin po expozici interferonu gama in vitro (148). Zvýšení hladiny NO během pozdní astmatické odpovědi je tedy v souladu se zvýšením genové exprese NOS 2 díky cytokinům produkováným buňkami z antigenem iritovaných dechových cest.

Další markery aktivity nemoci

Množství sloučenin dosahuje již několik stovek. Jak již byly vzpomenuty leukotrieny- metabolity arachidonové kyseliny, které provádějí vazokonstrikci a působí jako prozánětlivé mediátory. Cysteinylové leukotrieny LTC₄, LTD₄ a LTE₄ jsou tvořeny především mastocyty a eozinofily a mohou způsobit kontrakci hladkých svalů dýchacích cest, exsudaci plazmy a zvýšenou hlenovou sekreci. V kontrastu LTB₄ má výraznou aktivitu podporující chemotaxi neutrofilů. Hladiny těchto sloučenin již byly v kondenzátu popsány.

Závěrem lze říci, že reakce NO v astmatických dechových cestách předpokládají výrazné relevantní biologické funkce pro NO v dechových cestách. NO rychle konzumuje cytotoxické reaktivní kyslíkové sloučeniny produkované během okamžité astmatické odpovědi.

Reaktivní produkty – peroxynitry jsou daleko méně reaktivní než superoxidy, což vede k akumulaci produktů dusičnanů. Tato akutní detoxikační role pro NO je podporována zvířecími modely astmatu, u nichž inhibice syntézy NO vede ke zhoršení toxické reakce na působení alergenu. Nitrosylační reakce nejdříve dominuje během pozdní astmatické odpovědi s akumulací SNO, která je předpokládána jako bezpečnostní zásobník pro uchovávání toxických NO derivátů (126). Zatímco NO může mít v dechových cestách i škodlivý efekt, právě dynamika hladiny NO u chemických procesů v astmatických cestách předpokládá, že NO může také sloužit jako ochrana v astmatické odpovědi.

Dalším relativně zajímavým markerem zánětu v astmatických cestách je pH kondenzátu vydechovaného vzduchu. Je měřitelné a stabilní po tzv. deaeraci s argonem a bývá středně alkalické u zdravých jedinců. V kontrastu u pacientů s astmatem kondenzát je acidický a normalizuje se během kortikosteroidní terapie. Lidské epitelie dechových cest odpovídají na extracelulární změny kyselin zvýšenou aktivitou glutaminázy, což vede k uvolnění amoniaku. Tento proces slouží jako udržení pH, což může být dysregulováno prozánětlivými cytokiny, umožňující snížení pH dechových cest u zánětlivých onemocnění dechových cest. Měření pH a amoniaku dechového kondenzátu umožňuje jednoduchou neinvazivní cestu sledování biochemických procesů odpovídající plicním onemocněním u lidí.

Nebulizovaná kyselinová iritace do dechových cest je používána ve výzkumu k indukci bronchokonstrikce, kašle a vyvolání změn plicních funkcí (434). Gastroezofageální reflux je příčinně spojen s chronickými astmatickými příznaky mechanismem mikroaspirací kyselé žaludeční tekutiny (205). Inhalace kyselé mlhoviny byla popsána jako riziko pro hospitalizaci u astmatika, bronchiální hyperreaktivitu a snížení plicních funkcí (405). V procesu objasnění potenciálních nežádoucích efektů kyselého insultu výzkumníci identifikovali, že kyselý pH dechových cest (27) zmenšuje funkci řasinek (274), způsobuje ztrátu epitelí (184) a zhoršuje viskozitu hlenu (183).

pH kondenzátu je kyselý především během akutní exacerbace astmatu s pH cca 5,2 a stoupá k normálu – pH 7,7 během ústupu příznaků se systematickou kortikoidní léčbou (192). Subjekty se stabilním astmatem mají normální pH. Nabízí se možnost, že pokles pH může být predisponujícím faktorem exacerbace astmatu a nevyrovnanost acidobasie dechových cest může se spolupodílet na patofyziologii astmatu.

Měření pH je vysoce reprodukovatelné s koeficientem variace 4 % mezi zdravými subjekty. Délka sběru kondenzátu signifikantně neovlivňuje pH. Vzorky mohou být ponechány přikryty při pokojové teplotě měsíc bez změny pH. Minimální zvýšení, které se objevilo u astmatických subjektů při pokojové teplotě může mít vztah ke ztrátě protonů nitritům, formování kyseliny dusičné a anorganické generování oxidu dusnatého. Vzorky zmrazené na -80 °C mají reproduktibilní hodnotu pH po letech skladování. Transport a skladování nezmrazených vzorků není hodnocen jako bariera reprodukovatelnosti vyšetření a hodnocení pH. Malý efekt slin na pH kondenzátu je předpokládán díky tomu, že je zde průchod vzduchu dutinou ústní. Avšak pH slin odebraných vzorků nekoreluje s EBC pH (192) a vyzkoušená experimentální acidifikace slin kyselinou citronovou jen minimálně ovlivní pH EBC (423). Slinná amyláza ve

vzorcích předpokládá kontaminaci. Možnost ovlivnění pH kondenzátu jídlem nebyla dosud došetřena.

Role amoniaku v neutralizaci kyselin dýchacích cest

Anatomické zásoby amoniaku v dechových cestách jsou zatím nejasné, ale je jasné, že jak horní, tak dolní cesty dýchací se podílejí na exhalaci amoniaku. Alveoly se zřejmě spolupodílejí na objemu amoniaku v dechových cestách doplňováním plynného amoniaku z plazmy. Amoniak je tvořen bakteriálními ureázami v dutině ústní (55) a je zřejmé, že v epitelích dechových cest je i výrazná glutaminázová aktivita.

Aktivita glutaminázy je regulována směrem dolů kombinací zánětlivých cytokinů interferonu gama a tumor nekrosis faktoru alfa. Imunohistochemicky je prokázáno, že glutamináza je vysoce exprimována v dechových cestách in vivo u zdravých subjektů, málo je exprimována u pacientů s akutní exacerbací astmatu a její tvorba se zvyšuje po podání systemových kortikoidů (372).

Amoniak může být měřen ve vydechaném vzduchu v plynné fázi selektivním iontovým průtokovým spektroskopem.

Byly zjištěny deficiencie v kondenzátu u hladin amoniaku, které se objevily při akutní exacerbaci. Střední koncentrace amoniaku v kondenzátu byla 10x nižší ve vzorcích od akutně nemocných astmatiků než od kontrol. U mnoha akutně nemocných astmatických pacientů je amoniak v EBC nedetekovatelný. Logaritmus koncentrace amoniakových iontů koreluje s měřením pH. Toto sledování jednoduché, reprodučibilní, dokonce i po delším skladování v pokojové teplotě.

Vzhledem k nestabilitě hladin biomarkerů kondenzátu se jednoduchost měření pH a amoniaku ukazuje jako velmi perspektivní.

Role HCO₃ a CO₂ a pH v chemii kondenzátu vydechaného vzduchu

Oxid uhličitý a hydrogenuhličitan jsou přítomny v EBC a jako všechny kyseliny a base ovlivňují pH. Oxid uhličitý může difundovat do a ven z kondenzátu v závislosti na teplotě, pH, povrchovém napětí a tlaku CO₂. Je těžké sledovat stabilní hodnocení pH v pufovaném EBC bez kontrol hladiny oxidu uhličitého. Měření pH a amoniakálních hladin v kondenzátu vydechaného vzduchu zajišťuje měření zásadních charakteristik dechových cest, které ukazují hraniční odchylky během akutního astmatu. Tato sledování jsou snadno předvídatelná

a stabilní během časově delšího skladování. Ačkoliv koncentrace vydechovaného amoniaku může být ovlivněna pH slin, pH kondenzátu není signifikantně ovlivněno. Nízké hladiny nalezené během astmatických exacerbací nemohou být vysvětleny ventilačními parametry, ale mohou být výsledkem selhání pH homeostatických mechanismů dechových cest.

Monitoring astmatu

Je obtížné monitorovat odezvu rozdílných skupin protizánětlivých léků u astmatu, není zde žádný jednoduchý test, který by mohl být použit ke kvantifikaci zánětu v dýchacích cestách.

Periferní krevní markery nejsou příliš adekvátní jako nejdůležitější mediátor a buněčná odpověď přichází lokálně v dechových cestách. Eosinofily v indukovaném sputu pochází více z proximálních, než malých dechových cest (341). Je jasné, že odlišné ukazatele zánětu dýchacích cest mohou být využity společně k monitoringu astmatu (239). Vydechovaný NO může být použit jako monitor efektu protizánětlivé léčby u astmatu (161) a exacerbace astmatu, ale také k spontánní (294), anebo steroidy indukované redukci (228). Je zde nedostatek dlouhotrvajících studií vydechovaného NO, společně s ostatními markery zánětu dechových cest ve sputu a vydechovaném kondenzátu, plicních funkcí a symptomů. Vydechovaný NO se chová jako marker rychlé odezvy, který je extrémně citlivý na léčbu steroidy, a může být signifikantně redukován po 6 hodinách po osamocené léčbě nebulizovanými kortikosteroidy (234) nebo po 2–3 denní léčbě inhalovanými kortikosteroidy (230), dosahující maximálního efektu po 2–4 týdnech léčby (230).

Důležitá věc v léčbě astmatu je zabránit předimenzované léčbě pacientů steroidy. Vysoká citlivost vydechovaného NO na léčbu steroidy je výhoda. Vyšší dávky inhalovaných steroidů nejsou vždy nezbytné k zlepšení kontrol astmatu, i v lehkém persistujícím astmatu (234). Na dávce závislá redukce ve vydechovaném NO byla demonstrována a zlepšení symptomů astmatu u lehkých astmatiků následující po léčbě nízkými dávkami inhalovaných steroidů (226), kde byla pozorována redukce v počtu eosinofilů ve sputu a celkové zlepšení symptomů jen po vyšších dávkách steroidů (209). To předpokládá, že hladiny vydechovaného NO mohou být velmi citlivé k detekci toho, zda je zánět adekvátně kontrolován (234).

Ačkoliv vydechované hladiny NO jsou normální u pacientů se středně těžkým astmatem léčeným steroidy (229), zvýšené hladiny byly pozorovány u pacientů s těžkým astmatem i přes léčbu orálními steroidy (397). Individuální hladiny NO, stejně jako individuální výde-

chové rychlosti musí být stabilizované a monitorované a když hladiny jsou nad nebo pod jasnou referenční hladinou, steroidní léčba by měla být redukována nebo posílena.

Srovnatelná výhoda vydechovaného NO je, že jeho hladiny se mohou zvýšit před jakoukoliv významnou změnou v ostatních parametrech, tak jako v plicních funkcích a eosinofilech ve sputu a což může také sloužit jako brzké varování před ztrátou kontroly (244) tak, že vydechované hladiny NO stoupají o 40 % a 100 % po 2 a 4 týdnech, respektive následují redukcí steroidní léčby (244) a toto zvýšení u hladin vydechovaného NO je spojeno se zhoršením plicních funkcí a symptomů astmatu.

Změny v eosinofilech následující po redukcí steroidů jsou pomalé (208). Prospektivní studie, které hodnotí astmatické exacerbace během času, kdy je NO použit jako rozhodující bod pro modifikaci inhalační kortikosteroidní léčby, bude potřeba hodnotit hladinu vydechovaného NO jako užitečnou cestu monitorování astmatu.

Systémové kortikosteroidy nemají žádný efekt na vydechovaný NO u normálních subjektů, ale snižují jejich hladiny u pacientů s astmatem (294).

Dechový kondenzát

Řada netěkavých sloučenin, včetně proteinů, byla v dechovém kondenzátu detekována.

Peroxid vodíku

Peroxid vodíku byl detekován v kondenzátu vydechovaného vzduchu u zdravých dospělých i dětí, ovšem se zvýšenou koncentrací u astmatu (16). Není zde však žádná korelace mezi hladinami vydechovaného peroxidu a věkem, pohlavím anebo plicními funkcemi u zdravých dětí (212), jakkoliv koncentrace vydechovaného peroxidu vodíku je ve vztahu k počtu eosinofilů a hyperreaktivitě dechových cest u astmatu a je elevována u těžkého nestabilního astmatu i když vydechovaný NO je významně snížen po léčbě steroidy (186). To zřejmě souvisí s faktem, že neutrofily, důležité v těžkém astmatu, generují vyšší objem superoxidových radikálů a také peroxidu vodíku (15).

Astmatičtí pacienti rovněž vydechují významně vyšší hladiny kyseliny thiobarbiturové a jejich reaktivních produktů, které tak nepřímou odraží zvýšení oxidativního stresu (16).

Leukotrieny

Leukotrieny (LTs) – skupina lipidových mediátorů derivovaných z arachidonové kyseliny cestou 5 lipooxygenázových patofyziologických cest jsou potenciální konstriktory a proinflamační mediátory, které se podílí na patofyziologii astmatu. Stanovitelné hladiny LTB₄, C₄, D₄, E₄ a F₄ byly popsány v kondenzátu vydechovaného vzduchu astmatiků i normálních subjektů (41).

Elevované hladiny LTB₄ v kondenzátu byly nalezeny u zdravých telat během experimentální hrudní infekce (349).

Zkouší se měřit leukotrieny v moči a zvýšené hladiny LTE₄ byly popsány u některých astmatických pacientů, ale nejsou konzistentně zvýšené po expozici alergenem (104). Alergenová provokace zvyšuje koncentrace LTC₄ a LTE₄ v BAL a v moči během brzké a pozdní astmatické odpovědi (349). Avšak měření mediátorů dechových cest v moči je problematické díky diluci plicemi derivovaného signálu a jeho ředěním v exkretu. Zvýšené hladiny LTE₄ byly rovněž nalezeny v indukovaném sputu během pozdní odezvy na alergen u pacientů s lehkým astmatem (280). U lehkých astmatických pacientů hladiny LTE₄, LTC₄ a LTD₄ v kondenzátu jsou po expozici alergenu zvýšeny až během pozdní astmatické odpovědi. Hladiny leukotrienů LTE₄, C₄, D₄ v dechovém kondenzátu jsou elevovány signifikantně u pacientů s středně těžkým a těžkým astmatem (165) a vysazení steroidů u těžkého astmatu vede ke zhoršení astmatu a následnému zvýšení vydechovaného NO a zvýšení koncentrací LTB₄, CDE₄ ve vydechovaném kondenzátu (166).

U sezonní alergické rýmy u pacientů nekuřáků bez astmatu zvýšení hladiny leukotrienů LTB₄ a E₄ popsali i čeští autoři (82).

Isoprostany

Isoprostany jsou nová třída prostanoidů formovaných volnými radikály cestou katalyzované lipidové peroxidace kyseliny arachidonové (307).

Jsou nejdříve esterifikovány jako membránové fosfolipidy, z nich jsou rozštěpeny fosfolipázou A₂ a cirkulují v plazmě, jsou vylučovány močí a mohou být detekovány v EBC a v BAL. Jejich formace je nezávislá na COX 1 a COX 2. Mohou být detekovány ELISA metodou (305). F₂ isoprostany jsou hlavními kandidáty pro měření oxidativního stresu in vivo. Jsou to stabilní sloučeniny, detekabilní ve všech normálních biologických tekutinách a tkáních (355) a jejich formování je zvýšeno systematických oxidativním stresem např.

u pacientů s diabetem (306), nebo ARDS (60). F2 isoprostany jsou redukovány antioxidanty, např. alfa lipoidní kyselinou u normálních subjektů (288).

Relativní nedostatek efektu kortikosteroidů na vydechovaný 8 izoprostan byl porovnáván v placebem kontrolované studii s dvěma odlišnými dávkami inhalovaných steroidů (226) a přináší důkaz, že inhalované kortikosteroidy nemusí být vždy velmi efektivní v redukcii oxidativního stresu. Vydechované isoprostany ovšem dle této práce mohou lépe odrážet aktivitu nemoci než vydechovaný NO.

Nitrosothioly jsou formovány interakcí oxidu dusnatého NO s glutathionem. Nitrosothioly byly prokázány v řadě studií v kondenzátu vydechovaného vzduchu zdravých subjektů a jsou zvýšeny u zánětlivých nemocí dýchacích cest (astma, CHOPN, i cystická fibróza). Jejich koncentrace se mění v závislosti na tíži nemoci a měření se rovněž nabízí jako neinvazivní marker dynamiky onemocnění (72).

Elektrolyty jsou dalším, snadno diagnostikovatelným markerem.

Deficit magnezia, stejně tak i zvýšená hladina vápníku byly popsány v kondenzátu u atopického astmatu. Při evidentní bronchodilataci po podání intravenozního magnezia u těžkého astmatu se rovněž nabízí využití hladiny Mg jako markeru astmatu (108).

Měření vydechovaného NO

Vydechovaný NO je obvykle měřen chemiluminiscencí, která využívá fotochemickou reakci mezi NO a ozonem generujícím se v analyzeru. Technika je citlivá, specifická a potvrzená plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. Obě metody byly standardizovány, guidelines byly publikovány a jsou široce používány (348). Standardizace metod umožňuje reprodukovatelnost měření v klinických laboratořích mezi jednotlivými centry, tím, že připravily tento užitečný test k monitoringu tíže astmatu a odezvy na terapii.

Vztah NO hladin v tíži astmatu a odezvy na léčbu

Vydechovaný NO je zvýšen u astmatu (386) a koreluje s bronchiální hyperreaktivitou, tj. provokační koncentrací, která způsobuje 20% snížení u FEV1 pro histamin a metacholin a navíc cvičením indukované astma je spojeno s vyššími hladinami NO. Další studie ukazují, že vydechovaný NO koreluje s eosinofily ve sputu, jistým markerem zánětu v dechových cestách.

Invazivní studie používající bronchoalveolární laváž demonstrují, že NO koreluje se zá-
nětlivými markery v bronchoalveolární lavážní tekutině, včetně počtu eosinofilů
a koncentrace cytokinů. Inhalované kortikosteroidy redukuje eosinofily a hladiny NO
a protizánětlivá terapie s antileukotrieny modifikuje solubilní IL 4 receptor a redukuje vyde-
chovaný NO se zlepšením plicních funkcí. Na druhé straně, stažení kortikoidů vede ke zvýše-
ní vydechovaného NO u těchto pacientů, kteří mají i zhoršení plicních funkcí **(386)**.

NO je zvýšen u astmatu díky zvýšené expresi NOS 2 v astmatických cestách epitelálních
buněk. NOS 2 je subjekt predominantně transkripčně regulován prozánětlivými cytokiny
(156). NOS 2 mRNA exprese v epitelích astmatických dechových cest je vyšší než u kontrol
in vivo, ale nezvyšuje se u astmatiků, kteří brali inhalační steroidy. Některé studie ukázaly, že
inhalační nebo intravenózní kortikoidy redukuje vydechovaný NO. In situ analýza astmatic-
kých dechových cest předpokládá, že NOS 2 exprese je redukována kortikosteroidy, společně
s redukcí vydechovaného NO. Glukokortikoidy inhibují expresi NOS 2 na mnoha úrovních –
inhibicí genu transkripce, redukcí mRNA translace a zvýšení degradace NOS 2 proteinů. Zvý-
šení NOS 2 mRNA u astmatu, které je snižováno kortikosteroidy, podporuje že NOS 2 expre-
se a generování NO je senzitivní měřítko zánětu v dechových cestách.

3 CHOPN

Biologie, diagnóza a management CHOPN

CHOPN představuje závažný medicínský problém, jehož léčba není dosud uspokojivá. Tato nemoc je charakterizována abnormálním zánětlivým procesem ve stěně dýchacích cest velkých i periferních, stejně jako v parenchymu jako odezva na inhalaci závažných nox, především kouření. Zánětlivý proces je charakterizován zvýšením počtu makrofágů, neutrofilů a T lymfocytů s predominancí CD8+ buněk. Zánětlivé mediátory hrají roli v CHOPN včetně LTB₄, IL 8 a TNF alfa. Zánětlivý proces v CHOPN je částečně odlišný od téhož u astmatu a vyžaduje do jisté míry odlišnou léčbu. Diagnóza CHOPN by měla být zvažována u pacientů s kašlem, produkcí sputa, dušností a historií současného, nebo předchozího kouření, nebo expozici rizikovým faktorům. Diagnóza by měla být doplněna průkazem obstrukční ventilační poruchy na spirometru. Přínosem pro pacienty by určitě bylo zlepšení metod pro časnou detekci, hledá se nová medikace skrze cílenou farmakoterapii a důležitá je identifikace kuřáků s odvykací léčbou jako terapií CHOPN.

Záněť a CHOPN

Role zánětu v patogenezi CHOPN je velmi důležitá. Chronický záněť je přítomen v dechových cestách a plicním parenchymu pacientů s tímto onemocněním, ačkoliv kompletní průběh zánětu je dosud nejasný. Zánětlivý proces je zčásti odlišný od astmatu zánětlivými buňkami, mediátory i zánětlivou odpovědí.

Kouření cigaret indukuje zánětlivou odpověď v dechových cestách a parenchymu kuřáků (311). Zánětlivé změny popsané u CHOPN jsou základem této odpovědi. Zánětlivá odpověď postihuje nejen dechové cesty, plicní parenchym, i plicní cévy (174). Makrofágy, T lymfocyty a neutrofilů jsou zmnoženy v mnoha částech plic. Aktivované zánětlivé buňky produkují počet mediátorů – včetně leukotrienů B₄, IL 8, TNF alfa a ostatních, schopných poškodit plicní struktury. Kromě zánětu jsou zde další procesy, důležité v patogenezi CHOPN – dysbalance proteináz a antiproteináz v plicích a oxidativní stres.

Zánětlivý proces u CHOPN se odlišuje tedy od procesu u astmatu v jiném zastoupení zánětlivých buněk, zánětlivých mediátorech, zánětlivé odpovědi a odpovědi na léčbu steroidy.

Jak dokumentovat zánětlivou odpověď u CHOPN

Plicní biopsie a různá histologická vyšetření patologických vzorků plic demonstrovaly zánětlivé změny v dechových cestách a plicním parenchymu u pacientů s COPD (210). V mukóze dechových cest velkých i malých je zvýšení makrofágů a T lymfocytů, především CD8 + T buněk.

Bronchoalveolární laváž – BAL může odrážet zánět v plicní periférii a je charakterizována hraničním zvýšením počtů makrofágů a neutrofilů (338).

Bronchiální biopsie ukazuje zvýšení makrofágů a T buněk, speciálně CD8+ buněk (317). Existuje také zvýšení počtu eosinofilů v dechových cestách u některých pacientů s COPD, převážně u těch s akutní exacerbací.

Indukované sputum, získané nebulizací hypertonického roztoku ukázalo zvýšení totálního počtu buněčných elementů a hlavně zvýšení makrofágů a neutrofilů (331). Byla nalezena inverzní korelace mezi proporcí neutrofilů a FEV1.

Zánětlivé markery v dechu

Byl zkoumán vydechovaný NO a bylo zjištěno zvýšení hladin u stabilní CHOPN a další zvýšení během exacerbací. Hladiny vydechovaného CO jsou rovněž zvýšeny u pacientů s CHOPN, ačkoliv tato měření jsou ovlivněna kouřením cigaret (295). Markery oxidativního stresu, včetně peroxidu vodíku a 8 isoprostanu jsou rovněž zvýšeny ve vydechovaném kondenzátu pacientů s diagnózou CHOPN.

Zánětlivé buňky a CHOPN

Mnohé zánětlivé buňky jsou přítomny a nebo aktivovány u CHOPN, ačkoliv jejich role v progresi onemocnění není zcela jasná.

Zvýšení počtu aktivovaných neutrofilů bylo nalezeno ve sputu a v tekutině BAL u pacientů s CHOPN. Neutrofilů jsou rovněž lehce zvýšeny v dechových cestách i v plicním parenchymu (220). Produkují řadu proteináz, včetně neutrofilní elastázy, katepsinu G a proteinázy3, která se může spolupodílet na destrukci parenchymu. Cirkulující neutrofilů ukazují stimulaci tvorby MAC 1 i CD 1 b/CD 18 u stabilních pacientů s COPD. Adherující neutrofilů se přesouvají do respiračního traktu, přitahovány neutrofilními chemotaktickými fak-

tory jako IL 8, leukotrien B4. Aktivované neutrofilie pak napomáhají hypersekreci hlenu a mohou se spolupodílet na elastolýze.

Makrofágy – v dechových cestách i v parenchymu je zvýšené množství makrofágů. Makrofágy mohou být aktivovány kouřením cigaret, přičemž pak dochází k uvolnění zánětlivých mediátorů, včetně tumor nekrosis faktoru alfa, IL 8 a LTB 4. Makrofágy hrají zřejmě důležitou roli v zánětu u CHOPN.

Je rovněž popsáno i zvýšení celkového počtu T lymfocytů v plicním parenchymu, v periferních i centrálních dechových cestách u pacientů s CHOPN, s největším zvýšením CD8+ cytotoxických buněk (317). Existuje korelace mezi počtem T buněk, velikostí alveolární destrukce a tíží obstrukce dechových cest. Bylo dokázáno, že kuřáci s COPD mají vysoký počet CD8 buněk v indukovaném sputu ve srovnání s kuřáky bez známek onemocnění CHOPN a zdravými jedinci (317). Také CD 8+ buňky, produkující IFN gama byly nalezeny v nižším počtu kuřáků s CHOPN než u kuřáků bez omezení dechových cest obstrukcí (414).

Zánětlivé mediátory u CHOPN

Přesné informace o produkci a roli mediátorů u CHOPN nejsou dosud dostatečné.

Reaktivní kyslíkové sloučeniny hrají rovněž významnou roli. Kouř z cigaret odhaluje vysoké koncentrace reaktivních kyslíkových sloučenin s přispěním zánětlivých buněk typu aktivovaných makrofágů a neutrofilů. Byly potvrzeny zvýšené koncentrace peroxidu vodíku ve vydechovaném kondenzátu, zvláště během exacerbací, které dokládají důkazy pro zvýšení oxidativního stresu u CHOPN.

Oxidativní stres zde může mít různé projevy jako oxidace antiproteáz (alfa 1 antitrypsin) a sekrečního leukopretázového inhibitoru (SLPi). Oxidanty také aktivují transkripční faktor Kappa B, který působí na expresi mnohých zánětlivých genů jako IL 8 a TNF alfa (350).

Lipidové mediátory jsou rovněž podstatnou součástí procesu. LTB4 je chemoatraktant neutrofilů a je zvýšen ve sputu pacientů s CHOPN (174). Pravděpodobně je původem z alveolárních makrofágů. Role prostaglandinů u CHOPN je zatím nejasná. 8 isoprostan je konstriktor v lidských dechových cestách. Trombocyty aktivující faktor (PAF) zvyšuje uvolňování LTB 4 z aktivovaných neutrofilů s předpokladem, že to může mít posilující efekt na neutrofilní zánět (379). Ještě však není potvrzeno, zda PAF je uvolňován z alveolárních makrofágů u pacientů s CHOPN.

Chemokin IL 8 je chemoatraktant pro neutrofilů a existuje ve vysokých koncentracích v indukovaném sputu u pacientů s CHOPN (220). Koncentrace IL 8 jsou elevovány v tekutině BAL u pacientů s CHOPN a korelují s počtem neutrofilů. Makrofágy, neutrofilů a epiteliální buňky dechových cest mohou produkovat IL 8 a ostatní chemokiny, včetně makrofágového zánětlivého proteinu 1 beta (MIP 1beta) a makrofágového chemotaktického peptidu MCP 1. MIP 1 beta je zvýšen u CHOPN ve srovnání s normálními subjekty a zdravými kuřáky. MCP 1 je zvýšeno v BAL tekutině jak u pacientů s CHOPN, tak i u zdravých kuřáků.

Cytokin TNF alfa aktivuje transkripci nukleárního faktoru KB, který aktivuje transkripci IL 8 genu v epiteliálních buňkách a v makrofázích. Ostatní cytokiny zahrnují GM-CSF a transformační růstový faktor b (TGF b) a epidermální růstový faktor (EGF). GM CSF je zvýšen u stabilní CHOPN, ale více je elevován během exacerbací. GM-CSF je důležitý pro přežití neutrofilů a může hrát důležitou roli v neutrofilním zánětu. TGF beta má zvýšenou expresi v epiteliálních a submukosálních buňkách u pacientů s CHOPN a může být zahrnut do strukturálních změn dechových cest u těchto nemocných.

Endoteliny – některé studie referovaly, že endotelin 1 (ET 1) existuje ve zvýšené koncentraci v indukovaném sputu pacientů s CHOPN. Také zvýšená exprese ET 1 v plicích endoteliálních buňkách u pacientů s CHOPN předpokládá, že ET 1 se může spolupodílet na nevasculární remodelaci spojené s hypoxickou plicní hypertenzí.

Neuropeptidy – byly studovány především dva neuropeptidy – substance P a vasoaktivní intestinální peptid (VIP). Substance P (SP) je detekována ve sputu pacientů s CHOPN ve zvýšené koncentraci. VIP byl nalezen v bronchiálních biopsiích u pacientů s CHOPN.

Již delší dobu existuje předpoklad o dysbalanci mezi proteinázami a endogenními antiproteinázami u CHOPN. Serinová antiproteináza zahrnuje antitrypsin, což je hlavní antiproteináza v plazmě a plicích a SLPI, která je hlavní antiproteinázou v dechových cestách. Oxidativní stres může oxidovat sulfhydrylové skupiny na methioninu v těchto antiproteinázách a poškozuje jejich schopnosti, nebo zde může být genetický polymorfismus, který redukuje produkci antiproteináz. Počet studií předpokládá, že enzymy (proteinázy), jsou uvolňovány v emfyzemu a zdá se, že způsobují alveolární poškození díky tvorbě proteinů. Skupina proteináz vztahujících se k CHOPN může degradovat kolagen a elastin, a tak poškozovat stěny alveolů. Enzymy atakují elastin a způsobují ztrátu elasticity dechových cest v plicích u pacientů s emfyzemem. Navíc fragmentované části elastinu mohou hrát roli chemotaktických agens pro makrofágy a neutrofilů, tak jako přetrvávající zánět. Mezi řadou proteináz jsou velmi důležité ty, které zahrnují neutrofilní elastázu a skupinu matrixových metaloproteináz (MMP) (113). V této skupině je zahrnuto celkem 20 metaloproteináz.

Markery nemoci u CHOPN, vydechovaný vzduch versus vydechovaný kondenzát

Analýza vydechovaného vzduchu má enormní potenciál jako non invazivní monitoring zánětu dechových cest a oxidativního stresu u CHOPN. Technika je jednoduchá a může být použita i u pacientů s těžkou nemocí. Protože technika je neinvazivní, je možné dělat opakované měření bez ovlivnění výsledků.

V současnosti se jednotlivé markery hodnotí individuálně, ale význam různých markerů je různý u jednotlivých nemocí, tak jako efekt terapie. Astma je charakterizováno velkým zvýšením vydechovaného NO, mírným zvýšením CO a středním zvýšením 8 izoprostanů, zatímco CHOPN je charakteristická lehce nebo vůbec nezvýšeným vydechovaným NO a velkým zvýšením vydechovaného CO, kyseliny thiobarbiturové, či 8 isoprostanů.

Z vydechovaných plynů je nejzajímavější **oxid dusnatý**.

Hladiny vydechovaného NO u stabilní CHOPN a chronické bronchitidy (**223**) jsou nižší než u kouřících i nekouřících astmatiků a nejsou odlišné od normálních subjektů. Tato redukce vydechovaného NO je díky efektu kouření tabáku, který snižuje eNOS (**402**) a redukuje vydechovaný NO (**223**), což se spolupodílí na vysokém riziku plicních a kardiovaskulárních nemocí u kuřáků cigaret. Navíc relativně nízká hladina vydechovaného NO u CHOPN jako efekt kouření cigaret může odrážet nízkou NOS 2 expresi (**366**) a zvýšení oxidativního stresu, který může přetvářet NO do formace peroxynitritů (**106**).

Pacienti s nestabilní CHOPN však mají vysoké hodnoty hladin NO ve srovnání s se stabilními kuřáky nebo nekuřáky s CHOPN (**295**), což může být vysvětleno neutrofilním zánětem a dysbalancí oxidant/antioxidant. Eosinofily, které jsou schopné exprese NOS 2 a produkce NO jsou přítomny i u exacerbací CHOPN (**368**). Acidoza, která je často spojena s exacerbací CHOPN, může zvýšit uvolňování NO (**194**). Plicní hypertenze má opačný efekt, takže pacienti s CHOPN a s plicním srdcem mají nízké hladiny vydechovaného NO (**63**), které mohou reflektovat jejich vliv na endoteliální uvolnění NO.

Malá část pacientů s CHOPN má zřejmě dobrou odezvu na kortikosteroidy a tito pacienti, kteří mají koexistenci s astmatem, mají zvýšený podíl eosinofilů v indukovaném sputu (**120**). Tito pacienti také mají zvýšený NO ve vydechovaném vzduchu (**324**). To předpokládá, že vydechovaný NO může být užitečný v předpovědi, kteří pacienti budou odpovídat na dlouhodobou léčbu inhalačními steroidy.

Oxid uhelnatý

Hlavní omezení měření vydechovaného CO v CHOPN je efekt cigaretového kouření, který maskuje zvýšení, které se může vyskytnout u různých nemocí. Není zde žádná diference ve vydechovaném CO u pacientů s chronickou bronchitidou (bez obstrukce dechových cest) ve srovnání s normálními subjekty (89), avšak vydechované hladiny CO jsou zvýšeny u exkuřáků (81) s předpokladem probíhajícího oxidativního stresu nebo zánětu. CO je indukován fibroblasty, vystavenými cigaretovému kouři (308). Je popsáno zvýšení CO ve vydechovaném vzduchu během akutních exacerbací CHOPN se snížením po uzdravení (48).

Vydechovaný kondenzát

Peroxid vodíku

Aktivace zánětlivých buněk včetně neutrofilů, mikrofágů a eosinofilů se odráží ve zvýšené produkci kyslíkových radikálů, které buď spontánně nebo za enzymově katalyzované reakce vedou k formování peroxidu vodíku. Tím, že peroxid vodíku je méně reaktivní než ostatní reaktivní enzymatické sloučeniny, má schopnost pronikat skrze biologické membrány a vstoupit do ostatních prostředí (118), protože je solubilní. Zvýšení peroxidu vodíku v dechových cestách je v rovnováze se vzduchem (95). Ve srovnání s buněčnými anioxidantovými nosičovými systémy extracelulární prostor a dechové cesty mají zřetelně méně schopnosti nést reaktivní kyslíkové sloučeniny (171). Na přenosu peroxidu vodíku se podílí jako nejvýraznější enzym kataláza, která je přítomna v nízkých koncentracích v respiračním traktu. Tak vydechovaný peroxid vodíku má potenciál jako marker oxidativního stresu v plicích.

Kouření cigaret způsobuje příliv neutrofilů a ostatních zánětlivých buněk do dolních dechových cest. Byly nalezeny pětkrát vyšší hladiny peroxidu vodíku v dechovém kondenzátu kuřáků než nekuřáků (316). Hladiny vydechovaného peroxidu vodíku jsou zvýšeny ve srovnání s normálními subjekty u pacientů se stabilním CHOPN a jsou zvýšeny během exacerbací (88). Kouření cigaret je nejčastější příčinou CHOPN, ale jen 10–20 % kuřáků má rozvinutou symptomatickou CHOPN. Žádné signifikantní diference nebyly nalezeny mezi hladinami peroxidu vodíku u aktivních kuřáků s CHOPN a subjekty s CHOPN, které nikdy nekouřily a není zde ani žádná korelace mezi vydechovanou koncentrací peroxidu vodíku a denní cigaretovou konzumpcí (315). Tak je oxidativní stres charakteristický rys CHOPN, koreluje

se zánětem dechových cest a nemůže být vysvětlen jen přítomností oxidantů v tabákovém kouři.

Leukotrieny

Leukotrieny, rodina lipidových mediátorů vznikajících z kyseliny arachidonové cestou 5 lipooxygenázy, jsou potentní konstriktory a prozánětlivé mediátory, které se spolupodílí na patofyziologii astmatu. Cysteinylóvé leukotrieny LTC₄, LTD₄ a LTE₄ jsou především generovány z mastocytů, eosinofilů a jsou schopné vyvolat kontrakci hladkých svalů, způsobují exsudaci plazmy a stimulují sekreci hlenu stejně jako regrutaci eozinofilů (263). V kontrastu LTB₄ mají potenciální chemotaktickou aktivitu směrem k neutrofilům (259). Stanovitelné hladiny LTB₄, C₄ D₄, E₄ a F₄ již byly popsány v kondenzátu vydechovaného vzduchu astmatických a normálních subjektů (223). Koncentrace LTB₄ jsou zvýšeny v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s CHOPN (227). To předpokládá, že LTB₄ může být zapojen v exacerbaci astmatu a může se spolupodílet na přísunu neutrofilů.

Isoprostany

Isoprostany jsou nová třída prostanoidů, tvořená volnými radikály katalyzovanou lipidovou peroxidací kyseliny arachidonové (307). Jsou tvořeny nejdříve v membráně esterifikovanými fosfolipidy, z nichž jsou uvolněny fosfolipázou A₂, cirkulují v plazmě a jsou vylučovány močí a mohou být detekovány v kondenzátu vydechovaného vzduchu a v BAL. Jejich tvoření je nezávislé na COX 1 a COX 2. Mohou být detekovány i metodou ELISA (305). F₂ isoprostany jsou hlavní kandidát na klinické měření oxidativního stresu in vivo. Močové hladiny isoprostanů, zejména 8 isoprostanu jsou zvýšeny u pacientů s CHOPN a klesají u pacientů s akutní exacerbací v souladu s jejich klinickým zlepšením (343). Koncentrace 8 isoprostanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu je zvýšena u normálních kuřáků cigaret, ale je výraznější u pacientů s CHOPN (304). Je zajímavé, že vydechovaný 8 isoprostan je zvýšen podobně u CHOPN pacientů, kteří jsou ex kuřáci jako u kouřících pacientů s CHOPN. Vydechované isoprostany v CHOPN jsou široce derivovány od oxidativního stresu při zánětu dechových cest, spíše než od kouření cigaret.

Nitrosothioly

Kuřáci mají neobvykle vysoké koncentrace antioxidantů v tekutině pokrývající lem epitelii a větší odolnost k oxidativnímu plicnímu poškození. NO je shromažďován v tekutině pokrývající stěnu epitelii respiračního traktu ve formě nitroskothiolů nebo peroxynitritů a vede k zvýšení vydechovaného NO. Chronický oxidativní stres přítomný v plicích může po vykouření cigarety snížit dostupnost thiolových sloučenin (197) a může zvýšit rozklad nitrosothiolů, což vysvětluje elevované hladiny S nitroskothiolů ve vydechovaném kondenzátu u zdravých kuřáků, které jsou v relaci k délce a intenzitě kouření (69). Hladiny vydechovaných nitritů a nitrátů jsou zvýšeny u CHOPN. U pacientů s CHOPN byla shledána signifikantní negativní korelace mezi FEV1 a nitrosinovými formacemi.

Kyselina thiobarbiturová

Dysbalance mezi oxidanty a antioxidanty je známa svou rolí v patogenenzi CHOPN. Kouření cigaret vede k převaze oxidantů v dolních dýchacích cestách, vedoucí k aktivaci plicních fagocytů. Tyto buňky produkují velké množství peroxidu vodíku, který po konverzi na hydroxyradikálové sloučeniny způsobuje peroxidaci nenasycených mastných kyselin buněčných membrán. Navíc cigaretový kouř samotný obsahuje velké množství kyslíkových radikálů, které reagují s molekulami přítomnými v dechových cestách. Některé molekuly peroxidu vodíku, které jsou rozloženy antioxidantními enzymy se mohou dostat do vydechovaného vzduchu. Podobně produkty lipidové peroxidace – ethan, pentan i thiobarbiturová kyselina reaktivní substance jsou těkavé a mohou být přítomné v kondenzátu vydechovaného vzduchu. Takto se dá prokázat přítomnost kyseliny thiobarbiturové, která koreluje s hladinami peroxidu vodíku u pacientů s CHOPN (314).

4 REVMATICKÉ NEMOCI, NEMOCI S POSTIŽENÍM PLICNÍHO INTERSTICIA VE VZTAHU K NO A KONDENZÁTU

Zvýšená produkce NO byla popsána během řady revmatických onemocnění (systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida, Sjogrenův syndrom, systémová skleróza). Nálezy zvýšené produkce NO tak v respiračním traktu mohou reprezentovat raný marker zánětu.

Experimentální a klinická pozorování byla v minulých letech shromážděna jako doklad o výrazné produkci NO během mnoha revmatických onemocnění.

Studie vydechaného NO u SLE, systémové sklerózy a Sjogrenův syndromu byla zdrojem mnohých pozorování. NO může hrát v revmatických onemocněních duální roli, to je prozánětlivou a protizánětlivou, závisející na objemu produkce, místě produkce v lokálním prostředí. Duální efekt NO na funkce lymfocytů a na apoptózu může být relevantní k patogenезe a klinice revmatických onemocnění. U myších modelů bylo demonstrováno, že Th 1 lymfocytární klony produkují NO po aktivaci a že NO inhibuje produkci cytokinů Th 1, ale ne Th 2 T buněčné klony po aktivaci buněčných receptorů (356).

Produkce cytokinů vyčištěnými T buněčnými subpopulacemi (Th1,2) byla zlepšena donory NO a není preferenčně inhibována cytokinovou sekrecí aktivovaných lidských Th 1 buněk in vitro (41).

Apoptóza je další důležitý mechanismus, skrze který se NO může spolupodílet na patogenезi revmatických onemocnění. Zvýšení poměru apoptózy vede k vypuštění cytoplazmatických a nebo nukleárních antigenů a může hrát centrální roli v vzniku a exacerbaci autoimunitních nemocí jakou je SLE. I když snížení apoptózy může hrát důležitou roli v imunoregulaci. Snížení apoptózy eosinofilů může být rozhodující v eosinofily zprostředkovaných onemocněních jako bronchiální astma a Churg Strauss vaskulitis a defektní apoptóza může způsobit přežívání autoreaktivních T lymfocytů, které jsou normálně odstraněny z hostitelova repertoáru. NO má rovněž možnost pro apoptotické i antiapoptotické akce. Nízké koncentrace NO inhibují apoptózu u normálních lidských B lymfocytů (285), zatímco vysoké koncentrace NO mohou indukovat apoptózu skrze formaci peroxynitritů (131).

Možná patogenetická role zvýšené NO produkce u autoimunitních nemocí.

Intracelulární antigeny mohou být uvolněny jako výsledek přímé cytotoxicity a zvýšené apoptózy v cílových orgánech. Snížení apoptózy autoreaktivních lymfocytů, kombinované s expanzí CD4 + Th 2 lymfocytů vede k aktivaci B buněk a produkci autoprotilátek. Imuno-

komplexy mohou zvyšovat produkci NO syntetázy v mikrofázích a v endoteliálních buňkách s výsledkem zvýšené NO produkce.

Systemový lupus erythematosus

SLE je nemoc neznámého původu, v které tkáně a buňky jsou poškozeny autoprotilátkami a imunitními komplexy. Nemoci jsou všeobecně multisystémové, dokonce někdy SLE může zahrnovat jenom jeden orgán a přídatné manifestace se objeví během času. Většina pacientských potíží s exacerbacemi je spojena s periodami, které se přihodí za čas.

Myší modely lupus like nemoci jsou spojeny s močovou zvýšenou sekrecí nitritů, zvýšenou produkcí NO makrofágy a zvýšením imunoreaktivní NO syntetázy v játrech a renální tkáni (318). Zvýšená produkce NO byla pozorována u pacientů s SLE ve srovnání s normálními jedinci (429), ale také byla pozorována nejvyšší hladina nitritů u pacientů s více aktivní nemocí. Aktivita nemoci je kalkulována na basi skore, které bere do součtu klinické, laboratorní a instrumentální aktivitové indexy, vztahující se k různým orgánům a systémům (SLE disease activity index nebo Evropský konsensus měření aktivity SLE). Klinická manifestace aktivity byla především kožní a kloubní. Podobné výsledky byly pozorovány i dalšími autory, kteří měřili serové hladiny nitrothyroxinu (metabolitu, který není ovlivněn dietou (135). Rovněž bylo demonstrováno, že SLE (43) je charakterizován zvýšenou produkcí NO, jako odezvy elevace serových nitritů (37_6uM/l u 46 pacientů s SLE ve srovnání k 15-7uM u kontrol p je menší než 0,01). Stejní autoři ukázali, že pacienti s aktivní nemocí mají mnohem více elevované hladiny serových nitritů, v korelaci s aktivitou nemoci, hodnocenou jako SLE disease activity index a s hladinou protilátek proti ds DNA. Endoteliální a keratinocytová exprese iNOS byla signifikantně elevována u pacientů se SLE ve srovnání s kontrolami a byla vyšší u pacientů s aktivní nemocí ve srovnání s inaktivním onemocněním.

Vydechaný NO

Větší než normální koncentrace byly popisovány u SLE pacientů (360). Hladina vrcholových koncentrací NO ve vydechaném vzduchu byla 64,8–27,5 ppb u 24 SLE pacientů ve srovnání k 31,6–7,7 ppb u kontrol.

Tito pacienti měli hodnocenu aktivitu onemocnění dle ECLAM skore. Ani jeden pacient neměl dominující respirační problémy (pleuritida, pneumonie). Radiologicky byl doklad intersticiální plicní nemoci, ale 15 z 25 mělo signifikantní snížení plicní difuzní kapacity a MEF

25, tedy test, který odráží funkce malých dýchacích cest a signifikantní inverzní korelace byla rovněž pozorována mezi eNO a MEF 25. Dokonce i v případě absence zjevné respirační nemoci studovaní pacienti měli vysokou prevalenci zhoršení plicních funkcí v souladu s literárními údaji. Smíšený vzor funkčního postižení plic, charakterizovaný lehkými abnormalitami v restrikcí a difuzi, spolu se snížením MEF 25 je společně popisován u SLE (362). Abnormality v respiračních funkcích u pacientů se SLE byly v relaci k zánětlivým reakcím. Alveolární lymfocytoza byla v korelaci se snížením plicní difuze (146). Peribronchiální a bronchiální inflamace stěny, společně s infiltrací intersticia mononukleáry, byla považována jako patologický základ pro obstrukci malých dýchacích cest (143). Inverzní korelace mezi naměřenou hodnotou NO a MEF 25 může podpořit hypotézu, že inflamace v dechových cestách způsobuje zvýšení eNO u pacientů s SLE, ale přímá pozorování (BAL, plicní biopsie) je potřeba k ozřejmění tohoto tvrzení.

Původ NO u SLE

Identita buněk produkujících NO u SLE a role NO v patogenezi nemoci jsou důležité otázky.

Představa je, že u aktivního SLE je zde široká aktivace endotelu v cévách. Aktivované endotelie mohou uvolňovat velké množství NO, v korelaci s evidencí zvýšené aktivity nemoci, založené na anti DNA hladinách a C3a hladinách (44). Korelace mezi vydechovaným NO a ECLAM skóre aktivity nemoci (360) může záviset na zánětu v dechových cestách a na zánětlivých cytokinech a ostatních cirkulačních faktorech uvolňovaných v místech jiných než v respiračním systému. Souhrnem lze říci, že NO produkce je zvýšena u pacientů s SLE poměru k aktivitě nemoci. Jednoznačná klinická signifikace tohoto pozorování zatím není zcela definována. Měření NO ve vydechovaném vzduchu je jednodušší a rychlejší test, který může dokumentovat zvýšení NO produkce u SLE. Zda měření NO je jeden z mnoha nespecifických markerů zánětu nebo zda může pomoci v dynamice nemoci u pacientů, ukáží teprve další sledování.

Fibrotizující alveolitida

Zde je silná exprese nitrotyrosinu a NOS 2 na makrofázích, neutrofilech a alveolárním epitelu u pacientů s aktivním zánětem během raného stadia nemoci. To je konsistentní s elevovanými hladinami vydechovaného NO u pacientů s fibrotizující alveolitidou. Zvýšené

hladiny vydechovaného NO jsou spojeny s aktivitou nemoci, což je doloženo s buněčným rozpočtem, získaným z tekutiny BAL a je redukováno po terapii steroidy (227).

5 CÍL PRÁCE

Cílem studie bylo ověřit, že koncentrace vybraných potenciálních markerů onemocnění dýchacích cest v kondenzátu vydechaného vzduchu jsou u nemocných zvýšené, liší se u jednotlivých typů onemocnění a odrážejí jejich tíži. U skupin asymptomatických pacientů s jasně stanovenou diagnózou umožní zvýšená hladina markerů dřívější diagnostiku exacerbace a u skupiny aktivních kuřáků může upozornit na rozvoj nového onemocnění. Takto lze metodu využít v oblasti prevence.

6 SOUBOR NEMOCNÝCH A METODY

Studovaná skupina této pilotní studie zahrnovala 124 osob, které se zařadily do studie jak z pacientů Kliniky pneumologie a hrudní chirurgie FN Bulovka v Praze, tak i pacientů Plicního oddělení Krajské nemocnice Tomáše Bati ve Zlíně. Z nich pak byly sestaveny jednotlivé podskupiny:

- a) zdraví nekuřáci v počtu 18 osob,
- b) 11 kuřáků bez jakýchkoliv projevů onemocnění dýchacích cest s normálními výsledky funkčního vyšetření plic,
- c) 20 pacientů astmatiků se známkami onemocnění nekontrolovaného léčbou,
- d) 15 astmatiků, kteří měli kontrolované onemocnění,
- e) 22 pacientů s exacerbovanou CHOPN,
- f) 15 pacientů s CHOPN bez známek exacerbace
- g) 18 pacientů s kryptogenní fibrotizující alveolitidou, kteří měli známky aktivity onemocnění, prokázány v BAL i HRCT vyšetřením.

Všichni účastníci zkoumané skupiny byli podrobeni rozboru anamnézy a fyzikálnímu vyšetření. Pokud byli zcela zdraví a neužívali žádnou medikaci, byli při normálním výsledku fyzikálního vyšetření zařazeni do skupiny zdravých klientů. Pacienti, kteří byli kuřáci, a neměli žádné obtíže, nebrali medikaci a měli rovněž normální nález na fyzikálním vyšetření, byli zařazeni do skupiny zdravých kuřáků. Zdraví jedinci byli vybráni z personálu oddělení, či kruhu přátel.

Pacienti, zařazení jako astmatici byli sledováni plicními ambulancemi obou uvedených pracovišť. Ti, kteří měli známky onemocnění kontrolovaného léčbou, byli asymptomatictí a přišli ke kontrole stavu. Nebrali žádnou, ani inhalační kortikoidní medikaci, měli normální plicní funkce a negativní poslechový nález.

Pacienti se známkami exacerbace astmatu neměli v době studie dosud zahájenou léčbu inhalačními nebo perorálními kortikosteroidy. Přišli do našich ambulancí pro potíže, měli poslechový nález vrzotů a pískotů a obstrukci prokázanou spirometricky. Rtg skiagram hrudníku vyloučil jinou příčinu potíží, nebyl však proveden standardně.

Stejná situace byla i u pacientů s CHOPN.

Pacienti s plicními fibrotizujícími procesy měli diagnózu stanovenou na základě potíží (progredující dušnost, kašel), s poslechovým nálezem krepitací nad plicními basemi, nálezem restriktivní plicní poruchy ve funkčním vyšetření plic a nálezem odpovídajícím UIP na HRCT

a nebo s morfologickou verifikací diagnózy. Ze skupiny byli vyloučeni pacienti s postižením plic při systémových onemocněních.

Sběr kondenzátu byl prováděn přístrojem EcoScreen (Jaeger Toennies, SRN). U tohoto přístroje podle výrobce nedochází ke kontaminaci vzorku kondenzátu slinami. Pacienti dýchali klidově dvakrát 15 minut do sběrače s použitím nosní svěrky. Kondenzát byl zmražen přímo v odběrové nádobce na teplotu $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ve suchém ledu byl převážen do laboratoře a před analýzou rozmražen pouze jednou.

Koncentrace dusitanů a dusičnanů byla vyšetřena metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (**198**). Koncentrace IL-1 β byl vyšetřeny metodou ELISA Quantikine Human IL-1 β (R&D Systems) a IL-18 setem Human IL-18 Elisa Kit (Medical biological laboratories). K porovnání výsledků mezi skupinami byla použita jednofaktorová analýza rozptylu po logaritmické transformaci koncentrací a Spearmanova pořadová korelace.

7 VÝSLEDKY

Klinické a fyziologické charakteristiky studovaných subjektů jsou shrnuty v tabulce 1. Koncentrace dusitanů a dusičnanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu uvádějí tabulka 2 a obrázky 1 a 2. Koncentrace dusičnanů ve skupinách zdravých nekuřáků i kuřáků byly navzájem srovnatelné ($P = 0,47$) a statisticky významně vyšší ($P < 0,01$) než výsledky ve skupinách nemocných osob. Rozdíly mezi ostatními skupinami nebyly nalezeny. U zdravých osob byla překvapivě zjištěna také velmi vysoká interindividuální variabilita koncentrací.

Koncentrace dusitanů u zdravých kuřáků byly o 43 % vyšší než u nekuřáků, nicméně rozdíl nedosáhl statistické významnosti ($P = 0,12$). Koncentrace dusitanů byly vyšší u nemocných s astmatem a exacerbací astmatu ve srovnání se zdravými osobami ($P < 0,05$), ale mezi skupinami nemocných s astmatem a exacerbací astmatu se nelišily. Při analýze zahrnující obě skupiny nemocných s astmatem a zdravé osoby bylo zjištěno, že se koncentrace dusitanů zvyšují s klesající hodnotou FEV_1 (obrázek 3). Korelace byla ale netěsná ($r_s = -0,31$, $P < 0,02$). V souboru nemocných s astmatem byla tato korelace na hranici statistické významnosti ($P = 0,06$). Statistická analýza koncentrací dusitanů u osob s astmatem vedla ke stejným závěrům i po vyloučení 4 kuřáků a srovnání se zdravými nekuřáky.

Hodnoty koncentrací dusitanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu u nemocných s exacerbací CHOPN byla vyšší než u nemocných bez exacerbace ($P < 0,05$) a u zdravých osob ($P < 0,01$), zatímco nemocní bez exacerbace měli zcela srovnatelné výsledky se zdravými osobami. Korelace mezi koncentracemi dusitanů a FEV_1 nedosáhla statistické významnosti ($P = 0,12$). Vyloučení kuřáků ze skupin nemocných CHOPN a zdravých osob nezměnilo závěry statistické analýzy.

Dusitany v kondenzátu byly v porovnání se zdravými osobami zvýšené i u nemocných s kryptogenní fibrotizující alveolitidou ($P < 0,05$) (obrázek 2).

Koncentrace IL-1 β byly vyšší než kvantifikační limit 1 pg/ml jen u 9 % subjektů z vyšetřeného souboru. Pro IL-18 bylo 12 % výsledků vyšších než 0,5 pg/ml. Jednalo se ve všech případech o vzorky nemocných osob, v kontrolním souboru byly všechny výsledky pod limity stanovitelnosti. Vzájemné srovnávání skupin nemohlo být provedeno pro malý počet pozitivních nálezů.

TABULKY

Tabulka 1. Charakteristiky subjektů

skupina	N	pohlaví (M/Ž)	věk (roky)	FEV ₁ (%)	TLC	FEV ₁ /FVC (%)
astma exacerbace	20	11/9	54,6±17,6	81,2±20,0	108±11,3	73,9±11,8
astma bez exacerbace	15	9/6	51,3±18,8	94,4±14,4	102±11,2	85,3±18,2
CHOPN exacerbace	22	16/6	68,3±12,0	52,5±22,3	108±12,2	61,1±17,3
CHOPN bez exacerbace	25	20/5	67,4±7,00	72,2±21,9	101±13,1	69,4±10,1
KFA	18	9/9	57,3±15,1	87,6±22,2	84,5±19,3	88,8±14,4
zdraví kuřáci	12	7/4	41,2±14,8	115±8,8	107±9,8	88,7±7,30
zdraví nekuřáci	19	11/7	35,9±11,0	111±10,4	100±10,6	87,4±5,50
všechny zdravé osoby	31	18/11				

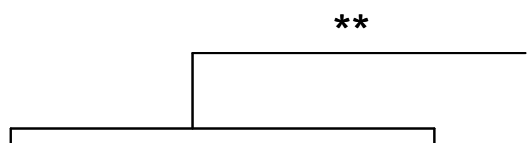
Tabulka uvádí průměry ± směrodatné odchylky

Tabulka 2. Koncentrace dusitanů a dusičnanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu

skupina	dusitany ($\mu\text{mol/l}$)			dusičnany ($\mu\text{mol/l}$)		
	N	průměr	průměr \pm SD	N	průměr	průměr \pm SD
astma exacerbase	18	5,09	2,11 – 12,3	18	30,5	16,1 – 58,0
astma bez exacerbase	14	5,13	2,75 – 9,56	14	33,1	14,2 – 77,6
CHOPN exacerbase	18	5,26	3,17 – 8,74	16	16,6	8,67 – 31,8
CHOPN bez exacerbase	14	2,96	1,32 – 6,67	13	18,9	7,68 – 46,5
KFA	13	5,47	2,94 – 10,2	12	18,1	11,2 – 29,1
zdraví kuřáci	12	3,56	2,15 – 5,89	11	70,4	22,8 – 217
zdraví nekuřáci	17	2,49	1,31 – 4,72	16	52,0	19,5 – 139
všechny zdravé osoby	29	2,89	1,58 – 5,28	27	58,9	20,9 – 165

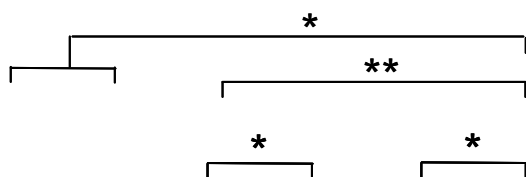
Tabulka uvádí geometrické průměry a odlogaritmované hranice intervalů (průměr \pm směrodatná odchylka logaritmů koncentrací).

Obr. 1



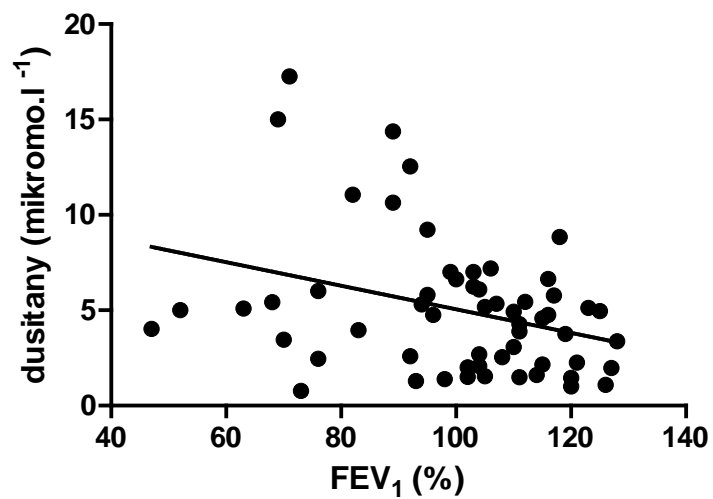
Obrázek 1: Koncentrace dusičnanů v kondenzátu vydechaného vzduchu u zdravých osob, nemocných s astmatem, chronickou plicní obstrukční nemocí a kryptogenní fibrotizující alveolitidou. Vodorovné linie jsou geometrické průměry. **... $P < 0,01$

Obr. 2



Obrázek 2: Koncentrace dusitanů v kondenzátu vydechaného vzduchu u zdravých osob, nemocných s astmatem, chronickou plicní obstrukční nemocí a kryptogenní fibrotizující alveolitidou. Vodorovné linie jsou geometrické průměry. *... $P < 0,05$, **... $P < 0,01$

Obr. 3.



Obrázek 3: Vztah mezi plicní funkcí a koncentracemi dusitanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu pozorovaný ve skupinách nemocných s astmatem a zdravých osob (koeficient pořadové korelace $r_s = -0,31$, $P < 0$)

8 DISKUSE

Od úvodní informace, že oxid dusnatý (NO) může být detekován chemiluminiscencí ve vydechovaném vzduchu u lidí (**162**) bylo nashromážděno velké množství literatury, popisující koncentrace různých zánětlivých markerů u zdravých i nemocných. Zvýšení koncentrace oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu bylo popsáno u dospělých (**229**); (**337**), (**293**), (**3**, **4**, **5**) i u dětí (**293**) (**300**) (**5**) s atopickým průduškovým astmatem.

Endogenní NO je syntetizován během konverze L-argininu na L-citrulin, katalyzované syntázami NO (NOS). Byly popsány tři izoformy enzymu NOS kódované odlišnými geny. Neuronální nNOS a endoteliální eNOS produkují relativně malé množství NO (pikomoly), které hraje homeostatickou roli v mnoha fyziologických i patofyziologických procesech. Indukovatelná NOS v kontrastu produkuje mnohem větší nanomolární hladiny v případě zánětlivých procesů v dýchacích cestách. Tato tzv. iNOS je regulována prozánětlivými stimuly a je exprimována zejména v buňkách epitelů dýchacích cest a v buňkách zánětu (**302**).

Koncentrace dusitanů a dusičnanů v tekutinách z dýchacích cest odrážejí rychlost tvorby a oxidativního metabolismu NO. Neinvazivním postupem je možné vyšetřit tyto koncentrace především v kondenzátu vydechovaného vzduchu, kam pronikají v kapénkách areosolu unášeného z dýchacích cest při klidovém dýchání.

Koncentrace cytokinů v kondenzátu vydechovaného vzduchu jsou velmi nízké a proto obtížně stanovitelné. V posledních letech v souvislosti s lepší dostupností citlivých analytických technik se zvyšuje počet studií referujících jejich využití u osob s onemocněním dýchacích cest (**413**).

V naší práci jsme se snažili zjistit, zda je možné koncentrace dusitanů a dusičnanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu využít k diagnostice a popřípadě k monitorování léčby nejčastějších plicních onemocnění. Zaměřili jsme se také na hladiny interleukinů IL-1 a IL-18, které jsou produkovány například makrofágy a jsou tak markerem zánětlivé reakce. Práci popisující koncentrace IL-18 v kondenzátu vydechovaného vzduchu jsme v literatuře nenašli.

Nejdůležitějším závěrem této studie je, že vyšetření koncentrace dusitanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu má základní charakteristiky markeru využitelného u nemocných s astmatem, CHOPN a KFA. Dusitany a dusičnany vznikají z oxidu dusnatého oxidací, která v organismu probíhá velmi rychle. V biologických tekutinách z dýchacích cest (tekutina z bronchoalveolární laváže, kondenzát vydechovaného vzduchu) převažují dusičnany, což odpovídá i výsledkům naší studie. Nález nejvyšších koncentrací dusičnanů ve skupině zdra-

vých osob, velikost průměrné koncentrace v této skupině a velmi vysoká interindividuální variabilita jsou překvapivé. S největší pravděpodobností lze tyto výsledky přisoudit kontaminaci vzorků kondenzátu při odběru, která je mnohem pravděpodobnější v případě dusičnanů než dusitanů. Kontaminace při zpracování a analýze vzorků je nepravděpodobná, protože paralelně se v každé analytické sérii pracuje s kalibračními standardy a vzorky kontroly kvality a při jejich analýze ke kontaminaci nedošlo. Zkušenosti jiných autorů upozornily na skutečnost, že v přístroji EcoScreen za okolností simulujících podmínky odběru může dojít ke kontaminaci vodných roztoků (fyziologický roztok a deionizovaná voda) projevující se zvýšením koncentrace NO_x (dusitany + dusičnany) až o 80 mikromol/l (206). V další publikaci autoři popsali tří- až čtyřnásobně horší krátkodobou opakovatelnost výsledku vyšetření dusičnanů ve srovnání s dusitany u zdravých osob a nemocných s astmatem, což nepřímo potvrzuje metodické problémy vyšetření dusičnanů při odběru kondenzátu přístrojem EcoScreen (198).

Srovnávání koncentrací dusitanů a dusičnanů mezi pracemi různých autorů je problematické pro odlišnosti v metodách sběru kondenzátu a analýzy koncentrací. Pokud se zaměříme na výsledky u zdravých osob, naše hodnoty dusitanů velmi dobře odpovídají nálezům, které získali Balint a spolupracovníci stejnou analytickou metodou při použití chladiče EcoScreen (26). Jiní autoři popisují srovnatelné hodnoty dusitanů ve vzorcích odebraných do chladičů vlastní konstrukce (312). Ve srovnání s naší studií, popsala u zdravých osob většina prací nižší koncentrace dusičnanů, výjimkou je práce autorů Corradi et al (271); (68).

Nárůst koncentrací dusitanů a dusičnanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu je u nemocných s chorobami dýchacích cest projevem zvýšené tvorby oxidu dusnatého po indukci enzymu iNOS ve strukturních buňkách dýchacích cest a v buňkách zánětu, která je výrazná zejména u atopického astmatu. Nemocní s atopickým astmatem před léčbou inhalačními kortikosteroidy vydechují vysoké koncentrace oxidu dusnatého (406). V souhlase s našimi výsledky potvrdila zvýšené koncentrace dusitanů nebo dusičnanů u nemocných s astmatem řada dalších publikovaných prací (114) (191) (415). Nicméně praktická využitelnost tohoto poznatku zůstává nadále nejasná, protože ve většině studií se nepodařilo prokázat vztah mezi koncentracemi metabolitů NO v kondenzátu na jedné straně a stupněm tíže nebo úrovní kontroly astmatu na straně druhé (415), (347). Zatím pouze jedna studie provedená u dětí s astmatem potvrdila význam současného vyšetřování několika markerů v kondenzátu vydechovaného vzduchu spolu s oxidem dusnatým (FENO) jako indikátorů odrážejících úroveň kontroly onemocnění (FENO, 8-izoprostan, γ -interferon a IL-4) a tíži astmatu (8-izoprostan, dusitany, dusičnany a FENO) (357). Negativní závěry některých publikovaných studií mohou zčásti spadat na vrub malých počtů nemocných v jednotlivých skupinách a nepřesností při

klasifikaci tíže onemocnění. Koncentrace dusitanů v naší studii neumožnily odlišit astma pod kontrolou a exacerbací astmatu, nicméně se zvyšovaly se zhoršující se plicní funkcí (pokles FEV₁). Podobně Ueno a spolupracovníci pozorovali statisticky vysoce významnou negativní korelaci mezi FEV₁ a koncentracemi dusitanů a dusičnanů u nemocných s astmatem **(415)**.

Nemocní s CHOPN vydechují nižší koncentrace vydechovaného NO ve srovnání s nemocnými s průduškovým astmatem před léčbou inhalačními kortikosteroidy **(238)**. Podle závěrů mnoha studií jsou koncentrace vydechovaného NO u nemocných s klidovou CHOPN stejné jako u zdravých osob **(89)**; **(201)**; **(366)**. Jiní autoři popisují mírné zvýšení FENO, které činí maximálně dvojnásobek hodnot u zdravých osob **(271)**, **(303)**, **(36)**.

Exacerbaci CHOPN doprovází nárůst koncentrací vydechovaného oxidu dusnatého, který nereaguje tak rychle na podávání IKS, jako tomu je u astmatu. K poklesu koncentrací FENO dochází na rozdíl od exacerbace astmatu pozvolna v průběhu měsíců po stabilizaci nemoci **(12)**.

Relativně málo studií se zaměřilo na koncentrace dusitanů a dusičnanů u nemocných s CHOPN, což může souviset s metodickými problémy vyšetření **(52)**. Koncentrace dusitanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu v naší studii byla vyšší u nemocných s exacerbací CHOPN než u nemocných bez exacerbace a u zdravých osob, zatímco nemocní bez exacerbace měli zcela srovnatelné výsledky se zdravými osobami. Corradi a spolupracovníci našli ve srovnání se zdravými kuřáky i nekuřáky zvýšené koncentrace dusitanů u nekuřáků s CHOPN bez exacerbace v období jednoho měsíce před vyšetřením **(71)**. V další studii se Corradi et al. věnovali vyšetření dusičnanů v kondenzátu a popsali vyšší koncentrace u zdravých kuřáků a nemocných s astmatem ve srovnání se zdravými nekuřáky, zatímco u nemocných s CHOPN se stejnými vstupními kritérii jako v předchozí studii hodnoty zvýšené nebyly **(68)**. Liu a spolupracovníci se zaměřili na vliv kouření a CHOPN na celkovou koncentraci produktů oxidace NO v kondenzátu (NO_x = součet koncentrací dusitanů a dusičnanů). Při odděleném hodnocení provedeném zvlášť s kuřáky a nekuřáky neměla CHOPN na koncentrace NO_x vliv **(271)**. Ve stejné studii byly koncentrace NO_x téměř dvojnásobné u nemocných kuřáků s větší tíží CHOPN, kteří zároveň byli léčeni inhalačními kortikosteroidy, ve srovnání s nemocnými nekuřáky s menší tíží CHOPN bez léčby kortikosteroidy. Ke zvýšení koncentrace NO_x také dochází vlivem exacerbace CHOPN **(424)**.

Kouření komplikuje interpretaci výsledků vyšetření exhalovaného oxidu dusnatého a jeho metabolitů v kondenzátu. Snižuje koncentrace FENO u zdravých osob **(319)**, a to v závislosti na expozici cigaretovému kouři měřené koncentrací kotininu v séru **(215)**. Mírně snížené hodnoty FENO byly zaznamenány také u osob udávajících kouření v minulosti po dobu delší

než jeden rok (215). Primárně snížené koncentrace NO u kuřáků ještě dále klesají a zůstávají nižší v intervalu 2 h po vykouření cigarety (282). Vliv pasivního kouření je u dospělých osob a dětí nejednoznačný zřejmě i z důvodu obtížného odhadu expozice (281). V práci, kterou publikovali Balint et al, měli zdraví kuřáci srovnatelné koncentrace dusitanů a dusičnanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu jako nekuřáci minutách (26). Corradi a spolupracovníci naopak pozorovali u kuřáků více než pětinasobné zvýšení (68). Akutní nitrační a oxidační stres vyvolaný cigaretovým kouřem se projevil zvýšenými koncentracemi NOx za 30 minut po vykouření dvou cigaret a návratem na původní hodnotu po 90 minutách (26). V naší studii jsme pozorovali pouze trend k vyšším koncentracím dusitanů u zdravých kuřáků ve srovnání s nekuřáky. Stejný závěr přinesla studie Liu a spolupracovníků, kteří vyšetřili koncentrace Nox (271). V obou zmíněných studiích byly počty osob ve skupinách nízké a variabilita nálezů v kondenzátu vysoká. Nízké počty osob byly také důvodem, proč jsme nemohli podrobně zkoumat vliv kouření a oddělit ho od vlivu exacerbace. Závěry o vlivu exacerbace a rozdílech mezi zdravými a nemocnými osobami byly stejné, když jsme z hodnocení vyloučili jednoho kuřáka astmatika s exacerbací, 3 kuřáky astmatiky bez exacerbace, 8 nemocných kuřáků s exacerbací CHOPN a 8 nemocných kuřáků bez exacerbace CHOPN, a výsledky srovnali se zdravými nekuřáky.

V podmínkách zánětu a zvýšeného oxidačního stresu v dýchacích cestách je biochemie NO velmi komplexní (281). V biologických tekutinách je NO nestabilní a zvláště za přítomnosti hemoglobinu se velmi rychle oxiduje na dusitany a dusičnany. Důležitá je také reakce NO s thioley za vzniku S-nitrosoproteinů a nízkomolekulárních S-nitrosothiolů (S-nitrosoglutathion, S-nitrosocystein). Nitrosothioly jsou transportní formou NO a modifikace thiolových skupin reakcí s NO je považována za jeden z mechanismů regulace aktivity enzymů. Při reakci NO se superoxidovým radikálem vzniká peroxodusitan, který nitruje aminokyseliny např. cystein, methionin, tryptofan a tyrosin. Stabilní látka 3-nitrotyrosin je považována za vhodný indikátor nitračního stresu. Významným zdrojem nitrotyrosinu kromě peroxydusitanu jsou také enzymy přítomné v aktivovaných neutrofilech a eosinofilech. Myeloperoxidáza a eosinofilní peroxidáza tvoří kyseliny HOCl a HOBr, které v dalších reakcích nezávislých na peroxodusitanu generují kromě nitrotyrosinu také chlorotyrosin a bromotyrosin. Volný nitrotyrosin je ale nacházen v kondenzátu v subnanomolárních koncentracích, které jsou analytickými technikami velmi obtížně detekovatelné a stanovení podílu nitrotyrosinu a tyrosinu v proteinech je velmi komplexní postup (281).

V kondenzátu vydechovaného vzduchu nemocných s CHOPN a průduškovým astmatem byly nalezeny změny v koncentracích některých cytokinů oproti hodnotám u zdravých osob.

Carpagnano a spolupracovníci popsali zvýšené koncentrace IL-6, IL-10 a TNF- α u nemocných s klidovou CHOPN a zdravých kuřáků (58), (57).

Koncentrace IL-6 byly vyšší u nemocných s exacerbací CHOPN než u nemocných s klidovou CHOPN a dobře odrážely účinky protizánětlivé a antioxidační farmakoterapie (59). Hodnoty koncentrací se ale pohybovaly na hranici kvantifikační schopnosti běžných komerčních ELISA esejí. Němečtí autoři použili k zakoncentrování vzorků lyofylizaci a k simultánní kvantifikaci několika cytokinů průtokovou imunochemickou metodu liquid multiplex bead array. U velké části souboru zdravých osob byly koncentrace IL1 β , -6, -8, -10, -12p70 a TNF- α nižší než 1 pg/ml (367). Tyto výsledky Rosias et al. potvrdili stejnou metodou a publikovali referenční rozmezí i pro další interleukiny IL-2, -4, -5 a -13 v řádu jednotek pg/ml (364). Gessner a spolupracovníci aplikovali metodu multiplex bead array v klinické studii s nemocnými s CHOPN a ukázali, že panel cytokinů je užitečným bioindikátorem exacerbace CHOPN (133).

ZÁVĚR

Je možné uzavřít, že v této studii dusitany v kondenzátu vydechovaného vzduchu splnily základní charakteristiky markeru využitelného u nemocných s astmatem, CHOPN a KFA. Hodnocení koncentrací dusičnanů bylo ovlivněno falešně zvýšenými koncentracemi z důvodu kontaminace vzorků kondenzátu při odběru. Koncentrace IL-1 β a IL-18 byly použitými ELISA soupravami ve většině vzorků neměřitelné.

LITERATURA

1. Abu Soud, H. M., Ichimori K., Elektron Transfer \Oxygen Building and Nitric Oxide feedback Inhibition in Endotelial Nitric Oxide Synthase In press
2. Abu Soud, H. M., R Gachhui, Raushel F. M., The Ferrous dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase, divergent effects of L arginine and tetrabiopterin on its stability. *J. Biol. Chem.* 1997 272 17349-17353
3. Abu Soud, H.M., Rousseau D.L. Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 1996 271, 32515-32518
4. Acevedo, M., Na(+) – H⁺ exchanger in isolated epithelial tracheal cells from sheep. Involvement in tracheal proton secretion. *Exp. Physiol* 1993; 78(3): 383-94
5. Acquisto, F. D. et al, Prostaglandins prevent inducible nitric oxide synthase protein expression by inhibiting nuclear factor-kappaB activation in J774 macrophages. *FEBS. Lett* 440 (1998) 76-80
6. *Acta physiol.Scand.* 1999 167 167-74
7. Adding L. C., Agvald P, regulation of pulmonary nitric oxide by karbon dioxide is intrinsic to the lung *Acta physiol. Scand*1999 167 167-74
8. Adding L. C., Agvald P., Artlich A., Beta adrenoreceptor against stimulation of pulmonary nitric oxide production in the rabbit *Br.J.Pharmacol.* 1999 126 833-9
9. Addock I. M., Brown CR., Oxidative stress induces NFkB DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells *Biochembiophys., Res. Comi.* 1994 199 1518-1523
10. Adishes, K. A., Exhaled and nasal nitric oxide is increased in laboratory animal allergy. *Clin Exp Allergy* 1998, 28: 876-880
11. Adler H., Beland J. L., Supression of herpes simplex virus type 1 induced pneumonie in mices by inhibition of inducible nitric oxide synthase *J. Exp. Med.*, 185 1997 1533
12. Agustí A. G., Villaverde JM, Togores B, Bosch M. Serial measurements of exhaled nitric oxide during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1999;14(3):523-8
13. Alving K., Weitzberg E.: Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics *Eur. Respir. J* 1993 6 1368-70, Lundberg JO., Farkas T., High nitric oxide production in human paranasal sinuses *Nat. Med.* 1995 1370-3

14. Alving, K., Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics, *Eur Respir J* 6 (1993) 1368-1370
15. Antczak, A. et al, Hydrogen peroxide in expired air condensate correlates positively with early steps of peripheral neutrophil activation in asthmatic patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 47 (1999) 119-126
16. Antczak, A. et al, Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur. Respir. J.* 10 (1997) 1235-1241
17. Archem S. Measurement of nitric oxide in biological models *Faseb J.*, 1993 7., 349-60
18. Arnal, J. F., et al, Nasal nitric oxide concentration in paranasal sinus inflammatory diseases, *Eur Respir J*, 13 (1999) 307-312
19. Arnelle, D. R., Stamler., J. S. NO⁺, NO⁻ and NO donation by S nitrosothiols implication for regulation of physical functions by S nitrosylation and acceleration of disulfide formation *Archives of Biochemistry and biophysics* 1995- 318,279-85
20. Artlich A., Single Breath Analysis of Endogenous Nitric Oxid in the Newborn *BiolNeonate* 79 2001 21-26
21. Asano K., constitutive and inducible synthase gene expression regulation and the activity in human lung epithelial cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 1994 10089-93
22. Assreuy, J., Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide, *Br J Pharmacol* 108 (1993) 833-837
23. Attur, M. G., et al, Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs:cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. *Inflamm. Res.* 49 (2000) 20-26
24. Babior, B., Phagocytes and oxidative stress, *Am J Med* 109 (2000) 33-44
25. Baker J. E, Holman P, Adaptation to chronic hypoxia confers tolerance to subsegment myocardial ischemia by increased nitric oxide production. *Annals of the New York Academy of Science* 1999 276 L571-80
26. Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* 2001; 56:456-61
27. Balmes, J. R., Potential bronchoconstrictor stimuli in acid fog. *Environ Health Perspect* 1989; 79: 163-6
28. Bannenberg Gl., Giammaresi C, Inhaled karbon dioxide inhibits košer airway nitric oxide formation in the guinea pig. *Acta PhysiolScand.* 1997 167 167-74

29. Baraldi E., Azzolin M., Effect of atmospheric nitric oxide on measurements of exhaled NO in asthmatic children. *Pediatr Pulmonol.* 1998 26 30-4
30. Baraldi E., Reference values of exhaled nitric oxide for healthy children *Pediatr Pulmonol.* 27 1999 54-8
31. Baraldi, E. et al, Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in children with acute asthma. *J. Pediatr* 131 (1997) 381-385
32. Baraldi, E. et al, Exhaled nitric oxide concentrations during treatment of wheezing exacerbation in infants and young children. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 159 (1999) 1284 - 1288
33. Barnes P. J. and Liew 1995, Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 1995; 16:128-130
34. Barnes P. J., Elvisi MG., Nitric oxide and lung disease *Thorax* 48 1993 1034-43
35. Barnes P. J., Inflammatory mediators of asthma an update *Pharmacol. Rev.* 1998 50 515-96
36. Barnes P. J., Kharitonov SA., Exhaled nitric oxide a new lung function test. *Thorax* 1996 51., 233-7
37. Barnes P. J., Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 48 1993 1034-1043
38. Barnes P. J., Therapeutic strategies for allergic diseases *Nature* 1999 402 B31-38
39. Barnes P. J., transcription factors and inflammatory disease *Host. Pract.* 31 1996 93-96
40. Barnett D., Breath acetone and blood sugar measurements in diabetes *Clinical sciences* 37 1969 570
41. Bauer, H. et al, Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1 – and T helper 2-associated cytokines in activated human T cells. *Immunology* 1997; 90: 205-211
42. Becher, G. et al, Breath condensate as a method of noninvasive assessment of inflammation mediators from the lower airways. *Pneumologie.* 51 Suppl 2:456-9 (1997) 456-459
43. Belmont, H. M et al, Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1810-16
44. Belmont, H. M., et al, Pathology and pathogenesis of vascular injury in systemic lupus erythematosus interaction of inflammatory cells and activated endothelium. *Arthritis Rheum* 1996; 39:9-22

45. Belvisi M. G. Nitric oxide synthase activity is elevated in inflammatory lung diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 283 1995 255-8
46. Berlyne G., Barnes P., New role for NO in asthma? *Lancet* 355 1029 1030
47. Beynon, J. R., Buffer solutions. Oxford, UK: Oxford University Press, 1996
48. Biernacki, W. et al, Carbon monoxide in exhaled air in patients with lower respiratory tract infection. *Eur Respir J* 12 (1998) 345S
49. Bisgaard, H. et al, NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene receptor antagonist montelukast. *Am. J. Respir Crit. Care Med.* 160 (1999) 1227-1231
50. Bodis, S. et al, Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 347-350
51. Borish, L. C. et al, Interleukin-4 receptor in moderate atopis asthma. A phase i/ii randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160 (1999) 1816-1823
52. Borrill ZL, Roy K, Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur Respir J* 2008; 32:472-86
53. Borson W. F., Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases and their relationships to alcohol metabolism *Hepatology* 6 1984 502-10
54. Brogan TV., Hedges RG, McKinneyS., Pulmonary NO synthase inhibition and inspired CO₂. *Eur. J. Respir.* 2000 16 288-95
55. Burne, R. A., Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 193(1):1-6
56. Calhoun, W. J., 1992, *Am. Rev. Respir. Dis.* 145, 317 - 325
57. Carpagnano GE, Foschino Barbaro MP, Cagnazzo M, Di Gioia G, Giliberti T, Di Matteo C, Resta O. Use of exhaled breath condensate in the study of airway inflammation after hypertonic saline solution challenge. *Chest.* 2005;128:3159-66
58. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur Respir J.* 2003;21:589-93
59. Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, Stefano A, Di Gioia G, Serviddio G, Gramiccioni E. Exhaled Interleukine-6 and 8-isoprostane in chronic obstructive pulmonary disease: effect of carbocysteine lysine salt monohydrate (SCMC-Lys). *Eur J Pharmacol.* 2004;505:169-75

60. Carpenter, C. T. et al, Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest*. 114 (1998) 1653-1659
61. Carr MJ., Hunter DD., Neurotrophins and asthma *Eur. Respir.J.* 1998 12 221-34
62. Cembzynska M. Elevated release of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 1993 291
63. Clini, E. et al, Production of endogenous nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease and patients with cor pulmonale. Correlates with echo-Doppler-assesment. *Am J Respir Crit Care Med* 16 (2000) 446-450
64. Cochran., F. R. Selén J., Herman P, Insights into the role of nitric oxide in inflammatory arthritis *Med. Rev.* 1996 16 547-563
65. Comhair, S. A. A., 2000, *Lancet* 355, 624
66. Conkle J. P., Trace composition of human respiratory gas. *Archives of environmental Health* 1975 290-95
67. Cope K., Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice implication for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology* 119 2000 1340-47
68. Corradi, M, Pesci A, Casana R, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, Cuomo A. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide* 2003;8:26-30
69. Corradi, M. et al, Elevated levels of nitrosothiols in breath condensate of healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2000) A857
70. Corradi, M., Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax* 54 (1999) 572-575
71. Corradi, M., Montuschi P, Donnelly LE, Pesci A, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163:854-8
72. Corradi, M., Montuschi P., Increased Nitrosothiols in Exhaled Breath Condensate in Inflammatory Airway Diseases Insitute of Respiratory Diseases, University of Parma, Italy. *amJ. respir. Crit. CareMed.* vol. 163 854-858 2000
73. Corradi, M., Pellizzoni A., Influence of athmospheric nitric oxide concentration on the measurement of nitric oxide in exhaled air. *Torax* 1998 53 673-6
74. Cremona G., HiggenbottamT.: Exhaled nitrix oxide in isolated pig lung *J. Appl. Physiol* 1995 78 59-63

75. Cremona G., Exhaled nitric oxide in isolated pig lung *J. Appl. Physiol* 1995 78 59-68
76. Cremona G., Higgenbotam T., Mixed expired nitric oxide in primary pulmonary hypertension in relation to lung diffusion capacity *Q J Med* 1994 87 547-551
77. Cremona G., Higgenbotam T., Hemodynamic effects of basal and stimulated release of endogenous nitric oxide in isolated human lungs *Cirk.* 1999 100 1316-21
78. Cremona G., Wood A., Effects of inhibitor of nitric oxide release and action on vascular tone in isolated lung of pig, Wheel dog and man *J. Physiol* 481 185-195
79. Crow, J. P. and Beckman, J. S., 1995, in *Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications*, eds. Ignarro L & Murad F (Academic Press), pp 17-43
80. Cucchiaro G., Tatum A.H., Brown MC., Inducible nitric oxide synthase in the lung and exhaled nitric oxide after hyperoxia *AmJ. Physiol* 1999 277 1636-44
81. Culpitt, S. V. et al, Exhaled carbon monoxide is increased in COPD patients regardless of their smoking habit. *Am J Respir Crit Care Med* 157 (1998) A787
82. Čáp P., Chládek J., Markery zánětu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u sezonní alergické rýmy a jejich dynamický profil v závislosti na pylové sezóně – Luhačovické dny 2003
83. Davis P. L., Endogenous isopropanol forensic and biochemical implications *Journal of Analytical Toxicology* 8 1984 209-12
84. de Gouw, H.W.F.M. et al, Exhaled nitric oxide (NO) is reduced shortly after bronchoconstriction to direct and indirect stimuli in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158 (1998) 315-319
85. de Vera M. D., Shapiro R.A., Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase gene by cytokines *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 1996 1054
86. Deem, S., Hedges R. G., Mechanism of improvement in pulmonary circulation by alveolar oxygen tension via airway nitric oxide. *American Physiological Society* 1999, 8750-7587
87. Deem, S., Hedges, R. G. Mc. Kinley s., Mechanism of improvement in pulmonary gas exchange during isovolemic Hemodilution. *J. Appl. Physiol* 1999 87 132-141
88. Dekhuijzen, P. N. et al, Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 154 (1996) 813-816
89. Delen, F. M. et al, Increased exhaled nitric oxide in chronic bronchitis. Comparison with asthma and COPD. *Chest* 117 (2000) 695-701

90. Demoncheaux E., Higenbottam T., Circulating nitrite anions are directly acting vasodilator and are donors for nitric oxide Clin.Sci. 2002 102 77-83
91. Derik, R. A. Erzurum S. C effects of nitric oxide and camp on smooth Musile proliferation Moss.J. editor Marcel Dekker, Inc New York 1999 131 333-349
92. Deykin A., Exhaled NO following repeated spirometry or repeated pletysmografy in healthy individuals Am. J. Respir. Crit. Cre. Med. 161 2000 1237-40
93. Di Giulio, Grilli A, De Luttis M. A, Does chronic hypoxia increase rat karotid body nitric oxide? Komparative Biochemistry and Physiology. 1998 120 243-7
94. Dillon WC., Hampl VOrigins of breath nitric oxide in humans Chest 1996 110 930-8
95. Dohlman, A. W. et al, Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. Am Rev Respir Dis 148 (1993) 955-960
96. Downes MJ., Edwards MW., Determination of a non volatile nitrosamine by using denitrosation and chemiluminescence analyser Analyst 1976- 101 743
97. Dubios AB., Kelley PMNitric oxide production and proportion and absorbtion in trachea bronchi, bronchioles and respiratory bronchioles of humans J. Appl. Physiol. 1999 86159
98. Duplain H., Sartori CExhaled nitric oxide in high altitude pulmonary edema Am. J. Respir. Crit.Care
99. Dweik, R. A, Laskowski D Nitric oxid synthesis in the lung, regulation by oxygen through a kinetic mechanism Journal of clinical investigation 1998 101 660-666
100. Dweik, R. A., Erzurum S.C effects of nitric oxide and camp on smooth Musile proliferation Moss. J. editor Marcel Dekker, Inc New York 1999 131 333-349
101. Dweik, R. A., Comhair SAA., Proceedings of the National Academy of sciences USA 98, 2622-27
102. Dweik, R. A., J. Clin. Inv., 101 650-661
103. Dworski, R. et al, Allergen-induced synthesis of F(2)-isoprostanes in atopic asthmatics. Evidence for oxidant stress. Am J. Respir Crit Care Med 160 (1999) 1947-1951
104. Dworski, R. Sheller, J. R., Urinary mediators and asthma. Clin. Exo, Allergy. 28 (1998) 1309-1312
105. Effros, R. M., Endogenous airway acidification: implications for asthma pathology (letter). Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 293-4
106. Eiserich, J. P. et al, Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. Nature 391 (1998) 393-397

107. Elliot, M. J. et al, Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994; 344: 1105-1110
108. Emelianov AV., Disorders in mineral metabolism at different stages of the development of bronchial asthma. *Ter Arkh* 1995 67 45-47
109. Etoh, T. et al, The effects of scleroderma sera on endothelial cell survival in vitro. *Arch Dermatol Res* 1990; 282: 516-19
110. Fagan K. A. Fouty B.W The pulmonary circulation of homozygous eNOS null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *The Journal of Clinical Investigation* 1999 103 292-299
111. Fang, K., 2000, *Am.J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 23. 1716-1721
112. Farrell, A. J., et al, Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1219-22
113. Filnay, G. A., Matrix metalloproteinases expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 240-247
114. Formanek W, Inci D, Lauener RP, Wildhaber JH, Frey U, Hall GL. Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease. *Eur Respir J* 2002;19:487-91
115. Fox, R. I. et al, Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol* 1994; 152:5532-39
116. Freedman, A. R., Energy requirements of the respiratory musculature in asthma. *Am. J. Med.* 1986; 80(2): 215-22
117. Freeman, B. A., 1995, in *Nitric Oxide, Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications*, eds. Ignarro L & Murad, F., (Academic Press), pp. 45-69
118. Freeman, B. A. et al, Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47 (1982) 412-426
119. Fretland DJ., Conner JR., Pitele BS., Curie MG., Inhibition of nitric oxide synthase and prospects for therapy in inflammatory diseases. *Cur Pharm Design* 1997 3, 447-62
120. Fujimoto, K. et al, Eosinophilic inflammation in the airway is related to glucocorticoid reversibility in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 115 (1999) 697-702
121. Funt J. F., Endogenous airway acidification. Implication for asthma pathophysiology. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 16. 2000 1216-26

122. Furukawa, K., Expression of nitric oxide synthase in human nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:847-850
123. Gao P. S. Variants of NOS 1, NOS 2 And NOS 3 genes in asthmatics *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 2000 761-63
124. Garvey EP., Oplinger JA., 1400W is a slow tight binding inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1997 271, 4959-4963
125. Gaston, B. Relaxation of human bronchial smooth Muscle by S nitrosothiols in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1994 268 978-84
126. Gaston, B., 1998, *Lancet* 351, 1317- 1319
127. Gaston, B., Drazen J. M., The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149 (1994) 538-551
128. Gaston, B., endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S nitrosothiols in human airways. *Proceedings of National Academy of Science of the USA* 1993-90 10957-62
129. Gaston, B., In: Crytsal RG, ed. *The Lung: Scientific Foundations* (2nd edition), Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: 239-253
130. Geller D. A Cytokines, endotoxin and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase *proc. Natl. Acad. Sci USA* 90 1993 522
131. Geller, D. A. et al, Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 7-23
132. Gerlach H., Rossaint R., Time course and dose response of nitric oxide inhalation for systemic oxygenation and pulmonary hypertension in patients with adult respiratory distress syndrome *Eur. J. Invest.* 1993 23 499-502
133. Gessner C, Scheibe R, Wötzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Engelmann L, Hoheisel G, Gillissen A, Sack U, Wirtz H. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2005; 99:1229-40
134. Giles, F., Comparison of the structural and inflammatory Features of COPD and Asthma. *Chest/117/5/May, 2000 Supplement*
135. Gilkeson, G. et al, Correlation of a serum measure of nitric oxide production with lupus disease activity measures (abstract). *Arthritis Rheum* 1996; 39: Suppl 9: S251
136. Gisis A., Saleh D, Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in patients with Pulmonary hypertension. *N. Engl. Med.* 333 (1995) 214-221
137. Goldstein S, Czapski. Kinetic of nitric oxide autoxidation in aqueous solutions in the absence and presence of various reductants *J. Am. Chem. Sol.* 1995 117 12078-84

138. Gow, A. J., The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide, *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 9027-9032
139. Granger d. L., Hibbs J. B., Metabolit fate of L arginine in relation to microbiosthatic capability of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 85 (1990) 264
140. Graseman H., A neuronal NO synthase NOS1 gene polymorphism is associated with astma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 2000 391-4
141. Gratziou, Ch., Exhaled nitric oxide in children. Relationship with chronic respiratory problems and atopy. *Eur Respir J* 1999; 14: Suoppl 30: 450s
142. Gratziou, Ch., Influence of athopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *Eur Respir J* 1999; 14: 897-901
143. Grennan, D. E. et al, Pulmonary involvement in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1987; 37: 536-9
144. Griese, M. et al, Asthma severity, recommended changes of inhaled therapy and exhaled nitric oxide in children: a prospective, blinded trial. *Eur J Med Res* 5 (2000) 334-340
145. Grimminger., F., spriesterbach R., Nitric oxide generation and hypoxic vasokonstriction in Buffer perfused rabbit lunte *The American Physiological Society* 1995 1509-1515
146. Groen, H. et al, Bronchoalveolar lavage cell analysis and lung function impairment in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 127-33
147. Gudbjörnsson, B. et al, Bronchial hyperresponsiveness to methacholine in patients with primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 36-40
148. Guo, F. H., 1997, *J. Clin. Inv.* 100, 829 - 838
149. Guo, F. H., Comhair S. A. A., Molekular mechanism of Increased Nitric Oxide in Astma Evidence for transcriptional and Post Translational Regulation of NO Synthesis. *J. Immunol* 164 (2000) 5970
150. Guo, F. H., Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl.Acad. Sci. USA* 92
151. Guo, F. H., Uetani K., Interferon gama and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxid synthase in human airway epithelium though synthesis of soluble mediators. *J. ClinInvest.* 100 (1997) 829
152. Guo, F., H., De Raeve H.R. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epitheilum in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1995 7809
153. Guo, F., H., *J. Immunol.* 2000, 164 5970-5980

154. Guo, F. H, Comhair S. A. A., Molecular Mechanism of increased nitric oxide in asthma J. Immunol. 164 2000 5970
155. Guo, F. H. et al, Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. J. Immunol 164 (2000) 5970-5980
156. Guo, F. H., Regulation of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium. Environmental Health Perspectives 106 (1998) 1119
157. Guo, F. H., Uetani K., Haque J., Interferon gama and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium though synthesis of soluble mediators. Journal of Clinical Investigation 100, (1997) 829-838
158. Guo, FH., De Raeve H. R., Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92 (1995) 7809'-7813
159. Gustaffson L. E., Exhaled nitric oxide as a marker in asthma. Eur. Respir. J. suppl. 1998 26 49-52
160. Gustafsson, L. E., Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, Guinea pigs and humans, Biochem Biophys Res Comm 181 (1991) 852-857
161. Gustafsson, L. E., Exhaled nitric oxide as a marker in asthma. Eur. Respir J Suppl. 26 (1998) 49S-52S
162. Gustafsson, L. E., Leone A. M, Presson, M. G Endogenous nitric oxide in present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. Biochem. biophys res. Commun 1991 181 852-857
163. Hague J., Williams B. R. G. Signal transduction in the interferon system. Semin. Oncol 25 (1998)14
164. Hamid, Q., Induction of nitric oxide synthase in asthma. Lancet 1993; 342: 1510-3
165. Hanazawa, T. et al, Increased Nitrotyrosine in Exhaled Breath Condensate of Patinets with Asthma. An. J. Respir Crit. Care Med. 162 (2000) 1273-1276
166. Hanazawa, T. et al, Nitrotyrosine and cystenyl leukotrienes in breath condensates are increased after withdrawal of steroid treatment in patients with asthma. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 161 (2000) A919
167. Hansen G., Berry G., Allergen specific Th 1 cells fail to counterbalance Th 2 cell induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation J. Clin. Invest. 103 1998 175

168. Hart L. A., Krishnan V. L., Activation and localisation of transcription factor, nuklear factor kappaB in asthma Am. J. Respir. Crit. Care Med. 158 1998 1585
169. Hayden Fg., Fritz R., Lobo M. C., Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virusinfection. Relation to symptom formationand host defense. J. Clin. Invest. 101 1998 643
170. Hebestreit, H. et al, Disruption of fas receptor signaling by nitric oxide in oesinophils, J Exp Med 187 (1998) 415-425
171. Heffner, J. E., et al, PULmonary strategies of antioxidant defense. Am Rev Respir Dis 140 (1989) 551-554
172. Henriksen, A. H., Exhaled and nasal NO levels in allergic rhinitis: relation to sensitization, pollen season and bronchial hyperresponisiveness, Eur Respir J 13 (1990) 301-306
173. Hessel E. M., Oosterhout A. J. M., Development of airway hyperresponsiveness is dependent on interferon gama and independent on eosinophil infiltration. Am. J. Respir. Cell. Moll. Biol. 16 1997 325
174. Hill, A. T., The interrelation ship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153:530-534
175. Ho, L. P. et al, The current single exhalation method of measuring exhales nitric oxide is affected by airway calibre. Eur Respir. J. 15 (2000) 1009 - 1013
176. Hogg., N. et al. S Nitrosogluthatione as asubstrate for gamma glutamyl transpeptidase. BiochemJ., 1997 323 str. 477-81
177. Hogman M., Stromberg Nitric oxide from the human respiratory tract Efficiently quantified by the standardized single breath measurement. Acta physiol. Scand 1997 159 354-6
178. Högman, A., Increased airway production of nitric oxide in asthmatic determined by elimination rate flow diagram, Am J Respir Crit Care Med 159 (1999) A862
179. Högman, M., Exhaled nitric oxide partitioned into alveolar, lower airways and nasal contributions, Respir Med 94 (2000) 985-991
180. Högman, M., Iteration NO analysis. Extended NO analysis applied to patients with COPD, allergic asthma and allergic rhinitis. Resp Med; 96 (2002) 24-30
181. Högman, M., Nitric oxide from the human respiratory tract efficiently quantified by standardized single breath measurements. Acta Physiol Scand 159 (1997) 345-346

182. Högman, M., Smokers increase the NO-flux from the airways to normal levels after four weeks of tobacco cessation. *Eur Respir J* 14 (1999) 445
183. Holma, B., pH- and protein- dependent buffer capacity and viscosity of respiratory mucus. Their interrelationships and influence on health. *Sci Total Environ* 1989; 84: 71 - 82
184. Holma, B., pH effects on ciliomotility and morphology of respiratory mucosa. *Arch Environ Health* 1977; 32(5): 216-26
185. Holt P. G., Prevention of adult asthma by early intervention during childhood. Potential value of a new generation immunomodulatory drugs *Thorax* 2000 55, 700-3
186. Horvath, I. et al, Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158 (1998) 1042-1046
187. Hou., Y. Seleno compounds and glutathione peroxidase catalysed decomposition of S nitrosothiols. *Biochem. BiophysRes. Commun* 1996 228 88-93
188. Howart, P. H., Airway inflammation and atopic asthma: a comparative bronchoscopic investigation. *Int Arch Allergy Immunol* 1991;4:266-9
189. Humbert M., The immunopathology of extrinsic and intrinsic (non atopic) asthma, more similarities than differences *Immunol today* 1999 20 528-33
190. Humbert, M., Bronchial mucosal expression of the gene encoding chemokines Rantes and MCP-3 in symptomatic atopic and non-atopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin-5, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, and IL-3. *Am J Respir Cell Moll Biol* 1997; 16:1-8
191. Hunt J, Byrns RE, Ignarro LJ, Gaston B. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma. *Lancet* 1995; 346:1235-1236
192. Hunt J., Gaston B. M., Endogenous airway acidification Implications for asthma pathology. *AmJ. Resp. Crit. Care Med.* 163 293-294
193. Hunt, J., Nitrogen oxide redox balance in asthma (abstr). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; 159(3), A860
194. Hunt, J. F. et al, Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2000) 694-699
195. Hurshman, A. R Marietta M., A Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase, spectral characterization and effect on catalytic activity. *Biochemistry* 1995, 34 5627-5634

196. Hutcheson I. R., Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin induced interstitial damage in rat. *Br. J. Pharmacol* 1990 101,815-820
197. Chambers. D. C. et al, Acute inhalation of cigarette smoke increase lower respiratory tract nitric oxide concentrations. *Thorax* 53 (1998) 677-679
198. Chladkova J, Krcmova I, Chladek J, Cap P, Micuda S, Hanzalkova Y. Validation of nitrite and nitrate measurements in exhaled breath condensate. *Respiration*. 2006; 73:173-9
199. Chung K. F., Cytokines in asthma *Thorax* 1999 54 825-56
200. Ide, Hiroshi, Nakano, Ogasa H., Regulation of pulmonary circulation by alveolar oxygen tension via airway nitric oxide. *American physiological society* 1999 8750 -7587
201. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:701-6
202. Ischiropoulos H., Ignacio M., Role of neutrophils and nitric oxide in lung alveolar injury from smoke inhalation *Am. J. resp. Crit. Care Med*. 150 (1994) 337
203. Iwamoto J., Pendergast DR., Effect of graded exercise on nitric oxide in expired air in humans *Respir. Physiol*. 1994 97 333-5.
204. Iyengar F., Stuehr D. J., Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N nitrosamine precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 84 (1987) 6369
205. Jack, C. i., Simultaneous Tracheal and oesophageal pH measurements in asthmatic patients with gastro-oesophageal reflux. *Thorax* 1995; 50(2);201-4
206. Jackson AS, Sandrini A, Campbell C, Chow S, Thomas PS, Yates DH. Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(3):222-7
207. Jansson B. O., Analysis of organic compounds in human breath by gass chromatography mass spectrometry *Journal of laboratory and Clinical Medicine* 74 1969 961-6
208. Jatakanon, A. et al, Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J. Respir. Crit. Care Med*. 161 (2000) 64-72
209. Jatakanon, A. et al, Effect of differing doses of inhaled budesonide on markers of airway inflammation in patients with mild asthma. *Thorax*. 54 (1999) 108-114
210. Jeffery, P. K., Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax* 1998; 53:129-13

211. Jia L., S nitrohaemoglobin a dynamic aktivty of blood involved in vascular kontrol. Nature 1996 380 221-6
212. Jöbssis, Q. et al, Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. Eur. Respir. J. 12 (1998) 483-485
213. Jorens, P. G., L-arginine dependent nitric oxide synthase: a new metabolic pathway in the lung and airways. Eur Respir J 1993; 6: 258-266
214. Jörres, R. A., Effective mucosal nitric oxide concentrations derived from exhaled air in asthmatic patients with and without steroids. Eur Respir J 10 (1997) 159
215. K.Sundy JS, Hauswirth DW, Mervin-Blake S, Fernandez CA, Patch KB, Alexander KM, Allgood S, McNair PD, Levesque MC. Smoking is associated with an age-related decline in exhaled nitric oxide. Eur Respir J. 2007;30:1074-81
216. Kaliner, M. et al, Sinusitis: bench to bedside, J Allergy Clin Immunol 99 (1997) S829-S848
217. Kaplan, S. et al, Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide, Infect Immun 64 (1996) 64-76
218. Karupiah G., Chen J. H., Rapid interferon gamma dependent clearance of influenza A virus and protection offrom consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2 deficient mice. J. Exp. Med., 188 1998 1541
219. Karupiah H., Xie Q., Inhibition of viral replication by interferon gamma induced nitric oxide synthase Science 261 1993 1445
220. Keatings, V. M., Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic pulmonary disease or asthma. Am J Respir Crit care Med 1996; 153:530-554
221. Keller D. A., Nussler A., K, Cytokines, endotoxin and glucokorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 522
222. Kharitonov S. A., et.al., Peak expiratory nitric oxide differences in men and women British heart j., 72 1994 243-245
223. Kharitonov, S. A. et al, Acute and chronic effects of cigarette smoking in exhaled nitric oxide. Am J Respir Crit Care Med 152 (1995) 609-612
224. Kharitonov, S. A. et al, Allergen induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. Am J. Respir Crit Care Med 151 (1995) 1894-1899

225. Kharitonov, S. A. et al, Decreased nitric oxide in the exhaled air of patients with systemic sclerosis with pulmonary hypertension. *Thorax* 1997; 52: 1051-55
226. Kharitonov, S. A. et al, Dose-dependent onset and duration of action of 100/400 mcg budesonide on exhaled nitric oxide and related changes in other potential markers of airway inflammation in mild asthma. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000) A186
227. Kharitonov, S. A. et al, Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2001) 1693-1722
228. Kharitonov, S. A. et al, Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur. Respir. J* 9 (1996) 196-201
229. Kharitonov, S. A. et al, Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 343 (1994) 133-135
230. Kharitonov, S. A. et al, Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J. Respir Crit. Care Med.* 153 (1996) 454-457
231. Kharitonov, S. A. et al, Nasal nitric oxide is increased in patients with asthma and allergy rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticoids, *J Allergy Clin Immunol* 99 (1997) 58-64
232. Kharitonov, S. A. et al, Prostaglandins E₂ and F_{2α} reduce exhaled nitric oxide in normal and asthmatic subjects irrespective of airway calibre changes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158 (1998) 1374-1378
233. Kharitonov, S. A. et al, Prostaglandins mediate bradykinin-induced reduction of exhaled nitric oxide in asthma. *Eur Respir J* 14 (1999) 1023-1027
234. Kharitonov, S. A. et al, Reduction in exhaled nitric oxide after a single dose of nebulised budesonide in patients with asthma. *Am. J. Respir Crit Care Med* 153 (1996) A799
235. Kharitonov, S. A., Allergen-induced late asthmatics reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1894-9
236. Kharitonov, S. A., Barnes P., Exhaled markers of pulmonary diseases *Am. J. respir. Crit., Care. Med.* 160 2001 1693-1722
237. Kharitonov, S. A., Barnes P., Nasal contribution to exhaled nitric oxide in single exhalations and the Change during exercise *Thorax* 1997 52 540-4
238. Kharitonov, S. A., Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002; 7:1-32
239. Kharitonov, S. A., Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur. Respir. J.* 16 (2000) 781-792

- 240.** Kharitonov, S. A., Exhaled and nasal nitric oxide measurements recommendations. *Eur. Respir. Journal* 10 1997-1683-93
- 241.** Kharitonov, S. A., Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994- 343. 133-5
- 242.** Kharitonov, S. A., Increased nitric oxide in exhaled air of human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* 1995, 8 295-297
- 243.** Kharitonov, S. A., the elevated level of exhaled nitric oxide in asthmatic patients is mainly derived from the lower respiratory tract. *Am.J. Respir. Crit. Care Med.* 153 1996 1773-80
- 244.** Kharitonov, S. A., Exhaled nitric oxide and carbon monoxide in asthma. *Eur Respir. J.* 9 (1999) 212-218
- 245.** Kilbourn, R. G. et al, Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumour necrosis factor, interleukin-1 or endotoxin. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 772-6
- 246.** Klebanoff S. J., Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: role of nitrite *Free. Radic. Biol. Med.*, 14 1993 351-360
- 247.** Kneppkens C. M., The potential of hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation *Free Radicals in biology and Medicine* 17 1994 127-160
- 248.** Kobayashi, H. et al, Decreased exhaled nitric oxide in mild persistent asthma patients treated with a leukotriene receptor antagonist, pranlukast. *Jpn. J. Physiol.* 49 (1999) 541-544
- 249.** Kobzik L., Bredt D. S., Lowenstein C. J, Nitric oxid synthase in human and rat lung immunohistochemical and histochemical localization *Am. J., respir. Cell. Mol. Biol.* 9 (1993) 371
- 250.** Kondo T, Distribution chemics coding and origin of nitric oxide synthase containing nerve fibres in the guinea pig nasal mucosa. *J. Auton. Nerve.Syst.* 80 2000 71-79
- 251.** Konzik L., Bredt D. S. ,Nitric oxid synthase in human and rat lung, immunohistochemical and histochemical localization. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* (1993)9, 371-377
- 252.** Kovacs, E. J. et al, Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J* 1994; 8: 854-861
- 253.** Kubes P., Granger D. N., Nitric oxide modulates microvaskular permeability *Am. J. Physiol* 1992, 611-615

- 254.** Kubes P., Sužuji M., Nitric oxide an endogenous modulátor of leukocyte adhesion *Proc. Natl. Acad., Sci USA.* 1991 88, 4651-4660
- 255.** Kumar A., Haque J., Double stranded RNAdependent protein kinase activates transscription faktor NF kappa B by phosporylating 1 kappa B*Proc. Natl. Acad. Scien. USA* 91 1994 6288
- 256.** Lancaster, J. R., Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1994 91 8137-8141
- 257.** Landino, L. M. et al, Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostanglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 15069-15074
- 258.** Lanz, M. J. et al, Comparison of exhaled nitric oxide to spirometry during emergency treatment of asthma exacerbation with glucocorticosteroids in children. *Ann. Allergy Asthma Immunol* 82 (1000) 161-164
- 259.** Larfars, G. et al, Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B₄, C₄ and D₄ in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 93 (1999) 1399-1405
- 260.** Larson, T., The Chemical neutralisation of inhaled sulfuric acid aerosol. *Am J Ind Med* 1980; 1(3-4): 449-52
- 261.** Leckie M. J., Effects of an Interleukin 5 blocking monoklonal antibodyon eosinophils, airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response *Lancet* 2000 356 2144-8
- 262.** Lee, P. et al, Mortality in systemic sclerosis (scleroderma). *Quart J Med* 1992; 82: 139-48
- 263.** Leff, A. R., Role of leukotrienes in bronchial hyperresponsiveness and cellular responses in airways. *Am J Respir Crit Care Med* 161 (2000) S125-S132
- 264.** Lehtimäki, L., Extended exhaled NO measurement differentiates between alveolar and bronchial inflammation, *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2001) 1557-1561
- 265.** Lehtimiaki L., et. al., Increased nitric oxide production in patiens with astma measured with a novel method of different exhalation flow rates *Ann. Med.* 32 2000417-23
- 266.** Leone AM., Gustaffson LE., nitric oxide is present in exhaled breath in humans. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 1994 201 883-7
- 267.** Leyung D. Y., Szeffler S. J., New insights into steroid resistant asthma. *Pediatr Allergy and Immunol.* 9 1998 3

- 268.** Liao J. K., Zulueta., J. L.Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. *J. CLin. Incest*, 1995 96 2661-2666
- 269.** Lipton, A. J., S nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature* 2001 413 171-4
- 270.** Lipworth, B. J. et al, Effects of adding a leukotriene antagonist or a long-action beta(2)-agonist in asthmatic patients with the glycine-16 beta(2)-adrenoceptor genotype. *Am J Med* 109 (2000) 114-121
- 271.** Liu J, Sandrini A, Thurston MC, Yates DH, Thomas PS. Nitric oxide and exhaled breath nitrite/nitrates in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiration*. 2007;74:617-23
- 272.** Lorch, S. A., Immunohistochemical localization of protein 3 Nitrotyrosine and S nitrosocysteine in a Murine Model of Inhaled Nitric Oxide Therapy. *Pediatric reserch* June 2000 47 798-805
- 273.** Ludviksdottir, D. et al, on behalf of the BHR study group. Increased nitric oxide in expired air in patients with Sjögren's syndrome. *Eur Respir J* 1999; 13: 739-743
- 274.** Luk. C. K., Effect of pH, viscosity and ionic-strength changes on ciliary beating frequency of human bronchial explants. *Clin Sci* 1983; 64(4): 449-51
- 275.** Lundberg J. O. Nasal nitric oxide in a man *Thorax* 54 1999 947-52
- 276.** Lundberg JO, Weitzberg E., Nordvahl SL Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener, s syndrome *Eur. Respir. J* 1994 7 1501-4(12,13)
- 277.** Lundberg, J. et al, High nitric oxide production in human paranasal sinus, *Nature Med* 1 (1995) 370-373
- 278.** Lundberg, J. O. Farkas Szalasi E High nitric oxide production in human paranasal sinuses *Nat. Med.*, 1995 1, 370-73
- 279.** Lundberg JO., Weitzberg E, Intragastric nitric oxide production in humans measurement in expelled air. *Gut* 1994 35 1543-6
- 280.** Macfarlane, A. J. et al, Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000) 1553-1558
- 281.** MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 2001; 429(1-3):195-207
- 282.** Malinowski A, Janson C, Holmkvist T, Norbäck D, Meriläinen P, Högman M. Effect of smoking on exhaled nitric oxide and flow-independent nitric oxide exchange parameters. *Eur Respir J.* 2006; 28:339-45

- 283.** Mancinelli, R., Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth, *Appl Environ Microbiol* 46 (1983) 198-202
- 284.** Mannick J. B., Fas induced caspase denitrosylation *Science* 1999 284 651-5
- 285.** Mannick, J. B. et al, Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 1994; 79: 1137-1146
- 286.** Mannick, J. B., Fas induced caspase denitrosylation *Science* 1999 284 651-5
- 287.** Mannick, J. B., S- Nitrosylation of mitochondrial caspases *J. Cell Biol.* 2001 154 1111-6
- 288.** Marangon, K. et al, Comparison of the effect alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free. Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1114-1121
- 289.** Marcin N, Riedel B., Exhaled nitric oxide during lung transplantation *Lancet* 1997 350 1681-2
- 290.** Marks-Konczalik, J. Chu S. C. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein and nuclear factor kappaB binding sites. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22201
- 291.** Martin, U., Increased levels of exhaled nitric oxide during nasal and oral breathing in subjects with seasonal rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97(3): 768-772
- 292.** Massaro AF., Mehta S., Elevated nitric oxide concentration in isolated lower airway gas of asthmatic subject *Am. J. respir. Crit. Care Med.* 1996;153:1510-4
- 293.** Massaro AF., Gaston B., Kita D., et al. Exhaled nitric oxid in pediatric astma and cystic fibrosis. *Arch dis Child* 1996 75 323-6
- 294.** Massaro, A. F. et al, Exhaled nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit. Care. Med.* 152 (1995) 800-803
- 295.** Maziak, W. et al, Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 157 (1998) 998-1002
- 296.** Mehta, S., 1997, *Am. J. Physiol.* 272. L124-L131
- 297.** Melillo G., Musso T., A Hypoxia responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase by oxygen. *J. Clin Invest.* 1995 96 2661-2666
- 298.** Mills PC, Marlin DJ., Nitric oxide and the exercise in the horse *J. Physiol* 1996 495 863-74

- 299.** Modin, A. et al, Nitric oxide regulates peptide release from parasympathetic nerves and vascular reactivity to vasoactive intestinal polypeptide in vivo. *Eur J Pharmacol* 1994; 261: 185- 197
- 300.** Moncada S., Higgs A., et al. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J. Med* 1993, 329: 2002-12
- 301.** Moncada S., Palmer RMJ., Nitric Oxide physiology, pathophysiology and pharmacology *Pharm. Rev.* 1991 43 109-141
- 302.** Moncada, S., The-larginine nitric oxide pathway. *N Eng Med* 1993; 329 (27): 2002-12
- 303.** Montuschi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest.* 2001; 120:496-50
- 304.** Montuschi, P. et al, Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (2000) 1175-1177
- 305.** Montuschi, P. et al, Increased 8-Isoprostane, a Marker of Oxidative Stress, in Exhaled Condensate of Asthma Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 160 (1999) 216-220
- 306.** Mori, T. A. et al, Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism.* 48 (1999) 1402-1408
- 307.** Morrow, J. D. et al, The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid res* 36 (1997) 1-21
- 308.** Muller, T. et al, The cellular stress response induced by aqueous extract of cigarette smoke is critically dependent on the intracellular glutathione concentration. *Carcinogenesis* 19 (1998) 797-801
- 309.** Nathan C., Nitric oxide as a secretory produkt of mammalian cells *FASEB J* 6 (1992) 3051
- 310.** Newsholme, E. A., The proposed role of glutamine in some cells of the immune systém and spekulative consequences for the whole animal. *Nutrition* 1997; 13(7-8):728-30
- 311.** Niewoehner, D. E., Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* 1974; 291:755-758
- 312.** Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1999; 54:1061-9
- 313.** Norwood, D. M., Breath ammonia depletion and its relevance to acidic aerosol exposure studies. *Arch Environ Health* 1992; 47(4): 309-13

- 314.** Nowak D., Kasielski M., Department of Pneumology and Allergology, Medical University of Lodz Poland. Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxid with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir: Med* 1999 93 389-396
- 315.** Nowak, D. et al, Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD. *Monaldi Arch Chest Dis* 53 (1998) 268-27
- 316.** Nowak, D. et al, Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J* 9 (1996) 652-657
- 317.** O'Shaughnessy, T. C., Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 852-857
- 318.** Oates, J. C. et al, Effect of late modulation of nitric oxide production on murine lupus. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 83: 86-92
- 319.** Olin AC, Rosengren A, Thelle DS, Lissner L, Bake B, Torén Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest*. 2006; 130:1319-25
- 320.** Oliver, B. et al, The effect of low dose theophylline on cytokine production in alveolar macrophages in patients with mild asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000) A614
- 321.** Oxidative Stress, in Exhaled Condensate of Asthma Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160 (1999) 216-220
- 322.** Palm JP, Graf P, Characterization of exhaled nitric oxide: Introducing a new reproducible method for nasal nitric oxide measurements *Eur. J. Respir. Journal* 2000 16 236-41
- 323.** Palmer a kol. Palmer RM., Ferrite AG., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor *Nature* 1987 327 524-6
- 324.** Papi, A. et al, Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (2000) 1773-1777
- 325.** Papi, S. A. et al, CD4-positive T-lymphocytes infiltrate the bronchial mucosa of patients with Sjögren's syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 637-641

- 326.** Paredi P, Ward S, Cramer D, Barnes PJ, Kharitonov SA Normal bronchial blood flow in COPD is unaffected by inhaled corticosteroids and correlates with exhaled nitric oxide. *Chest*. 2007; 131:1075-81
- 327.** Paredi P., exhalation flow and pressure controlled reservoir collection of exhaled nitric oxide for remote and delayed analysis. *Thorax* 53:1998 775-79
- 328.** Paredi, P. et al, Exhaled nitric oxide is increased in active fibrosing alveolitis. *Chest* 1999; 115: 1352-56
- 329.** Pasto, M. et al, Nasal polyp-derived superoxide anion. Dose-dependent inhibition by nitric oxide and pathophysiological implications 163 (2001) 145-151
- 330.** Pearson, M. G., Single breath oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994; 343:146-147
- 331.** Peleman, R. A., The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13: 839-843
- 332.** Person MG., Midtvedt T., Ca²⁺ dependent and Ca²⁺ independent exhaled nitric oxide presence in germ free animals and inhibition by arginine analogues *Eur. J. Pharmacol.* 1994 264 13-20
- 333.** Persson M. G., Zetterstrom O., 1994 *Lancet* 343 146-7
- 334.** Persson MG., Kalzen H., Oxygen or low concentration of nitric oxide reverse pulmonary vasoconstriction induced by nitric oxide synthase inhibitors in rabbits. *Acta Physiological. Scand.* 1994 150 405-11
- 335.** Persson MG., Longvist, PA., positive end expiratory pressure ventilation elicits increases in endogenously formed nitric oxide as detected in air exhaled by rabbits *Anaesthesiology* 1995 82 969-74
- 336.** Persson MG., Wiklund NP., Endogenous nitric oxide in single exhalation and the change during exercise. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993 148 1210-4
- 337.** Persson MG., Zetterstrom O., Agrenius V., et. al. Single breath nitric oxide measurements in asthmatic patient and smokers. *Lancet* 1994, 343: 146-7
- 338.** Pesci, A., Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of interleukin-8. *Chest* 1997; 112:505-510
- 339.** Phillips., C. R Exhaled nitric oxide during exercise *J. Appl. Physiol* 80 1996 1865-71
- 340.** Piacentini GL., Bodini A., Influence of environmental concentrations of NO on the exhaled NO test. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998 158 1299-301

341. Pizzinichi, E. et al. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur. Respir J.* 11 (1998) 828-834
342. Potena, A. et al, Increased bronchial responsiveness in primary and secondary Sjögren's syndrome. *Eur Respir J* 1990; 3: 548:553
343. Pratico, D. et al, Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F₂alpha- III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 158 (1998) 1709-1714
344. Prescott, R. J. et al, Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992; 166: 255-63
345. Radi, R., 1999, *Methods Enzymol.* 301, 353-367
346. Radomski M. W., Palmer RM. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible but not constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 87 (1990) 10043
347. Ratnawati, Morton J, Henry RL, Thomas PS. Exhaled breath condensate nitrite/nitrate and pH in relation to pediatric asthma control and exhaled nitric oxide. *Pediatr Pulmonol.* 2006; 41:929-36
348. Recommendations for a standardized procedure for the online measurements of exhaled nitric oxide in adults. In: the official statement of the American Thoracic Society Recommendations for the standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children- 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 160 (1999) 2104
349. Reinhold, P. et al, Breath condensate--a medium obtained by a noninvasive method for the detection of inflammation mediators of the lung. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 112 (1999) 254-259
350. Repine, J. E., Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 146: 341-357
351. Ricciardolo, F. I. M, et al, Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108 (2001) 198-204
352. Ricciardolo, F. L. M. et al, Effects of inhaled bradykinin and allergen on exhaled nitric oxide in relation to airway caliber in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2001) A435

- 353.** Rimmar S., Gillis C. Selektive pulmonary vasodilatation inhaled nitric oxide is due to hemoglobin inactivation *Circulation* 1993 88 2884-7.
- 354.** Robbins RA., expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells *Biochem. Biophys Res. Commun* 203 1994 209-18
- 355.** Roberts, L. J., Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 505-513
- 356.** Robinson Taylor, A. W. et al, Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 980-984
- 357.** Robroeks CM, van de Kant KD, Jöbsis Q, Hendriks HJ, van Gent R, Wouters EF, Damoiseaux JG, Bast A, Wodzig WK, Dompeling E. Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma
- 358.** Rolla, G. et al, Exhaled nitric oxide and pulmonary response to iloprost in systemic sclerosis with pulmonary hypertension. *Lancet* 1998; 351: 191-92
- 359.** Rolla, G. et al, Exhaled nitric oxide in systemic sclerosis: relationship with lung involvement and pulmonary hypertension. *J Rheumatol* 2000 (in press)
- 360.** Rolla, G. et al, Increased nitric oxide in exhaled air of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24:1066-71
- 361.** Rolla, G. et al, Nitric oxide in systemic sclerosis lung: controversies and expectations. *Clin Exper Rheumatol* 1998;16: 522-24
- 362.** Rolla, G. et al, Respiratory function in systemic lupus erythematosus. Relation with activity and severity. *Lupus* 1996; 5: 38-43
- 363.** Romain, A., Global strategy for the diagnosis, management and prevention of CHOPN. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop Summary. *Am J Respir Crit Care Med*, Vol 163. pp 1256-1278, 2001
- 364.** Rosias PP, Robroeks CM, Kester A, den Hartog GJ, Wodzig WK, Rijkers GT, Zimmermann LJ, van Schayck CP, Jöbsis Q, Dompeling E. Biomarker reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers. *Eur Respir J.* 2008; 31:934-42
- 365.** Rubbo, H. et al, Nitric oxide regulation of tissue free radical injury, *Chem Res Toxicol* 9 (1996) 809-820

- 366.** Rutgers, S. R., et al, Markers of nitric oxide metabolism in sputum and exhaled air are not increased in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 54 (1999) 576-580
- 367.** Sack U, Scheibe R, Wötzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Emmrich F, Hoheisel G, Wirtz H, Gessner C. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry A*. 2006; 69:169-72
- 368.** Saetta, M. et al, Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 150 (1994) 1646-1652
- 369.** Saleh, D. et al, Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FASEB J* 12 (1998) 929-937
- 370.** Sampath D., Castro D., Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activation of transcription pathway in asthma *J. Clin. Invest.* 103 1999 1353
- 371.** Sanders S. P *Am. J. Res. Cell. Biol* 21 147-9
- 372.** Sarantos, P., Glucocorticoids regulate glutaminase gene expression in human intestinal epithelial cells. *J Surg Res* 1994; 57(1): 227-31
- 373.** Sartori T. Exhaled nitric oxide does not provide a marker of vascular endothelial dysfunction in healthy humans. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 160 1999 879-82
- 374.** Sato, K. et al, Lack of inhibitory effect of dexamethasone on exhalation of nitric oxide by healthy humans, *Intern. Med.* 35 (1996) 356-361
- 375.** Sehnert S. S., Breath biomarkers for detection of human liver diseases a preliminary study. *Biomarkers* 2001
- 376.** Shaul P. W., Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J. Clin. Invest.* 94 1994 2231-36
- 377.** Sheel AV., Road J., Exhaled nitric oxide during exercise. *Sports Med* 1999 28 83-90
- 378.** Sheu F. S, Direct observation of trapping and release of NO by glutathione and cysteine with electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biophys J*. 78 2000 1216-26
- 379.** Shindo, K., Enhancement of leukotriene B4 release in stimulated asthmatic neutrophils by platelet activating factor. *Thorax* 1997; 52: 505-510
- 380.** Schedin U., Frostell CPersson MG., Contribution from upper and lower airways to exhaled endogenous nitric oxide in humans *Acta Anaesthesiol. Scand* 1995 39 327-32
- 381.** Schedin U., Norman M., Endogenous nitric oxide in upper airways of premature and term infants *Acta Paediatr* 1997 86 1229-3
- 382.** Schmidt, H. H., NO from NO synthase *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 1996 93 14492-7

- 383.** Schubert J. K., Application of a new method for the analysis of exhaled gas in critically ill patients Intensive care medicine 24 1998 415-21
- 384.** Silkoff P. E., Marked flow dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide Am J Respir Crit Care Med. 155 1997 260-67
- 385.** Silkoff P. E. S., McLean P.A Exhaled nitric oxide and bronchial reactivity during and after beclomethasone in mild asthma. J. Asthma 35 1998 473
- 386.** Silkoff, P. E., Noninvasive measurement of airway inflammation using exhaled nitric oxide and induced sputum. Clinics in Chest Medicine 21 (2000) 345
- 387.** Slutsky, A. S. et al, Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children – 1999, Am J Respir Crit Care Med 160 (1999) 2104-2117
- 388.** Spahn J. D., Leung D. Y. M., New insights into the pathogenesis and management of steroid resistant asthma J. Asthma 34 1997 177
- 389.** St. Clair, E. W. et al, Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. J Exp Med 1996; 184: 1173-78
- 390.** St. Croix CM., Wetter TJ., Assessment of nitric oxide formation during exercise. Am J Respir Crit Care Med. 1999 159 1125-53
- 391.** Stamler J. S., S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. Proc. Natl. Acad. Sci USA 89 1992 444-8
- 392.** Stamler, J. S. Redox signaling nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. Cell. 1994 78 931-6
- 393.** Stefanovic-Racic, M. et al, N-monomethyl-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. Arthritis Rheum 1994; 37: 1062-69
- 394.** Sternberg PA., Snelder JB., Increased exhaled nitric oxide on days with high outdoor air pollution is of endogenous origin Eur. Respir. J., 1999 13 334-7
- 395.** Steudel W., Exhaled nitric oxide production by nitric oxide synthase-deficient mice. Am J Respir Crit Care Med. 162 2000 1262-7
- 396.** Stichtenoth, D. O. et al, Urinary nitrate excretion is increased in patients with rheumatoid arthritis and reduced by prednisolone. Ann Rheum Dis 1995; 54: 820-4
- 397.** Stirling, R. G. et al, Exhaled NO is elevated in difficult asthma and correlates with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. Thorax. 53 (1998) 1030-1034

- 398.** Stone B. G., Effects of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men. *Lipids* 28 1993 705-8
- 399.** Stromberg S., Lonquist PA Lung distension and karbon dioxide affect pulmonary nitric oxide production, Binding M., Miller W., NO chemiluminiscence in exhaled air., interference of compounds from endogenous or exogenous sources *Eur. Respir. J.*, 1997 10, 21-30
- 400.** Stromberg S., Lonqvist PA, Persson MG., Lung distension and karbon dioxide affects pulmonary nitric oxide formation in the anaeshtetized rabbit. *Acta Physioll. Scand* 1997 159 59-67
- 401.** Stuehr D. J Griffith O. W. Mammalian nitric oxid synthases *Adv. Enzymol. Realt. Areas Mol. Biol* 65 (1992) 287-346
- 402.** Su, Y. et al, Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 19 (1998) 819-825
- 403.** Tamaoki, J., et al, Effect of inhaled indomethacin in asthmatic patients taking high doses of inhaled corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immunol* 105 (2000) 1134-1139
- 404.** Tanaka K., Nakazawa H., Nitric oxid mediates murine cytomegalovirus associated pneumonitis in lungs that are free of the virus. *Clin. Invest* 100 1997 1822
- 405.** Tanaka, H., Acid fog and hospital visits for asthma; an epidemiological study. *Eur Respir J* 1998; 11(6): 1301-6
- 406.** Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax.* 2006;61:817-27
- 407.** Thibeault DW., Rezaiek MH., Compressed air as a source of inhaled oxidants in intensive care units. *Am.J. Perinatol.* 1999 16 497-501
- 408.** Trujillo M., Xanthine oxidase mediated decomposition of S nitrosothiols. *J. Biol. Chem* 1998 273 7828-3415
- 409.** Trujillo, M. et al, Peroxynitrite biochemistry: formation, reactions and detection, *Analisis* 28 (2000) 518-527.
- 410.** Tsoukias N., Tannous MZ., Single exhalation profiles of NO and CO₂ in humans *J. Appl. Physiol.* 85 642-652
- 411.** Tsoukias, N. M., A two-compartment model of pulmonary nitric oxide Exchange dynamics, *J. Appl Physiol* 85 (1998) 653-666
- 412.** Tsuino I, Myiamoto K, PRoduction of nitric oxide in intrathoracic airways of normal humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 199647 355-9

- 413.** Tufvesson E, Bjermer L Methodological improvements for measuring eicosanoids and cytokines in exhaled breath condensate. *Respir Med.* 2006;100:34-8
- 414.** Tzanakis, N., Subpopulations of CD8⁺ cells (Tc1, Tc2) in induced sputum of COPD patients and smokers without COPD. *ATS 2001 American Journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 163, April 2001
- 415.** Ueno T, Kataoka M, Hirano A, Iio K, Tanimoto Y, Kanehiro A, Okada C, Soda R, Takahashi K, Tanimoto M. Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. *Respirology.* 2008;13:654-63
- 416.** Uetani K., central role of double stranded RNA activated Protein Kinase in Mikrobial Induction of Nitric Oxide Synthase *J. Immunol* 165 2000 988
- 417.** Uetani K., Thomassen. M. J, Interferon gama induction of human nitric oxide synthase 2 though an autocrine loop via respiratory epithelial cell derived soluble mediator *Am.J. Physiol* 280 (2001) 1179
- 418.** Ungerer, R. G. et al, Prevalence and clinical correlates of pulmonary artery hypertension in progressive systemic sclerosis. *Am J Med* 1983; 75: 65-74
- 419.** Utell, M. J., Air pollution and asthma: clinical studies with sulfuric acid aerosols. *Allergy Proc* 1991; 12(6): 385-8
- 420.** Vain., A. F., Malenkova I. V., Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S nitrosothiols *Nitric Oxide* 1997 191-203
- 421.** Van Der Vliet, A. et al, Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in respiratory tract, *Am J Respir Crit Care Med* 160 (1999) 1-9
- 422.** Vandivier, R. W. et al, Down-regulation of nitric oxide production by ibuprofen in human volunteers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 (1999) 1398-1403
- 423.** Vaughan, J. Stability of exhaled breath precipitate pH during experimetal salivary acidification. *Am J Respir Crit care Med* 2001; 163(3): A408
- 424.** Vier C, Hecht B, Becher G, Rothe M, Hammerschmidt S, Wirtz H, Gillissen A. Clinical significance of H₂O₂, nitrite/nitrate and pH in exhaled breath condensate during and after acute COPD exacerbation (abstract) *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171 (suppl 1): A932
- 425.** Vodovotz, Y. et al, Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor. *J Exper Med* 1993; 178:605-13

- 426.** Wakita M., Nishimura G., The pulmonary circulation of homozygous eNOS null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999, 103 291-299
- 427.** Walker, C., Allergic and non-allergic asthma have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and BAL. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 109-115
- 428.** Wallin, A. et al, The effects of regular inhaled formoterol, budesonide and placebo on mucosal inflammation and clinical indices in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 159 (1999) 79-86
- 429.** Wanchu, A. et al, Nitric oxide synthesis is increased in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1998; 18: 41-3
- 430.** Wechsler M., Exhaled nitric oxide in patients with asthma. Association with NOS 1 genotype *Am. J. Respir. Crit.CareMed.* 162 2000 2043-7
- 431.** Welbourne, T. C., Renal glutamine metabolism and hydrogen ion homeostasis. In: Haussinger, D., Sies, H., eds. *Glutamine metabolism in mammalian tissues*. New York. Springer-Verlag, 1984;161-177
- 432.** Wilson, A. M. et al, Antiasthmatic effects of mediator blockade versus topical corticosteroids in allergic rhinitis and asthma. *Am. J. Respir Crit Care Med* 162 (2000) 1297-1301
- 433.** Wink, D. A., Hanbauer M. B. Chemical biology of nitric oxide: regulation, protective and toxic mechanism *Current topic in cellular regulation* 1996 34, 159-187
- 434.** Winther FO. Experimentally induced cough in man by citric acid aerosol. An evaluation of a method. *Acta Pharmacol Toxicol* 1970; 28(2), 108-12
- 435.** Wood, L. G. et al, Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids* 35 (2000) 967
- 436.** Wu, W., 2000, *J. Clin. Inv.* 105, 1455-1463
- 437.** Xu, S. Y. et al, The development of an assay for neutrophil lipocalin to be used as a specific marker of neutrophil activity in vitro and in vivo. *J Immunol Meth* 1994; 171: 245-252
- 438.** Yamamoto, T. et al, Increased production of nitric oxide stimulated by interleukin-1 in peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1123-25

439. Yamamoto, T. et al, Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998; 25: 314-17
440. Yang Y. L., Defficient signaling in mice devoid of double stranded RNAdependent protein kinase *EMBO J.*, 14 1995 6095
441. Yates, B. H. et al, Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152 (1995) 892-896
442. Yates, B. H., et al, Endogenous nitric oxide is decreased in asthmatic patients by an inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Respir Crit. Care Med.* 154 (1996) 247-250
443. Zeher, M. et al, Correlation of increased susceptibility to apoptosis of CD4+ T cells with lymphocyte activation and aktivity of disease in patients with primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1673-81
444. Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO ALving K., Salivary contribution to exhaled nitric oxide *Eur. Respir J.*, 1999 13 327-33

SEZNAM ZKRATEK

ATS	- American Thoracic Society
BAL	- bronchoalveolární laváž
cGMP	- guanosyncyklického monofostfátu
CT	- počítačová tomografie (Computed Tomography)
EBC	- kondenzát vydechovaného vzduchu
eNOS	- endotelialní enzym syntézy NO
ERS	- European Respiratory Society
ET 1	- endotelin I
FAD	- flavinadenindinukleotid (vitamin B12 navázaný na ADP)
FENO	- frakce oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu (Fraction Exhaled Nitric Oxid)
FEV ₁	- usilovně vydechnutý objem vzduchu za 1 s
FiO ₂	- koncentrace O ₂ ve vdechovaném vzduchu (Fraction of Inspired Oxygen)
FMN	- flavin mononukleotid
GC-MS	- hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií
HCD	- horní cesty dýchací
HRCT	- počítačová tomografie ve vysokém rozlišení (High Resolution CT)
CHOPN	- chronická obstrukční plicní nemoc
IFN gama	- cytokin interferon gama
IKS	- inhalační kortikosteroidy
KFA	- kryptogenní fibrotizující alveolitida
KVV	- kondenzát vydechovaného vzduchu
LTs	- Leukotrieny
MEF	- výdechové rychlosti v dýchacích cestách
mRNA	- messenger ribonukleová kyselina
MMP	- matrixové metaloproteinázy
MS	- moderní hmotnostní spektrometrie
NADPH	- nikotinamidadenindinukleotidfosfát, koenzym, součást metabolismu orgnismů
NO	- oxid dusnatý
NOS	- NO syntetázy
PAF	- destičkový aktivující faktor

RNS	- reaktivní nitrosloučeniny
ROS	- reaktivní kyslíkové sloučeniny
SNO	- S nitrosothioly
SP	- Substance P
TGF	- transformující růstový faktor
TNF alfa	- cytokin tumor nekrosis faktor alfa
UIP	- viz KFA
VIP	- vasoaktivní intestinální peptid

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1:** Koncentrace dusičnanů v kondenzátu vydechaného vzduchu u zdravých osob, nemocných s astmatem, chronickou plicní obstrukční nemocí a kryptogenní fibrotizující alveolitidou 54
- Obrázek 2:** Koncentrace dusitanů v kondenzátu vydechaného vzduchu u zdravých osob, nemocných s astmatem, chronickou plicní obstrukční nemocí a kryptogenní fibrotizující alveolitidou 55
- Obrázek 3:** Vztah mezi plicní funkcí a koncentracemi dusitanů v kondenzátu vydechaného vzduchu pozorovaný ve skupinách nemocných s astmatem a zdravých osob 56

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Charakteristiky subjektů 52

Tabulka 2. Koncentrace dusitanů a dusičnanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu 53