

Autoreferát disertační práce

Kondenzát vydechovaného vzduchu v diagnostice plicních nemocí

MUDr. Vladimír Řihák

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

Klinika pneumologie a hrudní chirurgie FN Bulovka

3. LFUK Praha

Obsah:

1. Úvod	3
2. Cíl práce	4
3. Přehled současných poznatků	4
4. Metodika	7
5. Výsledky	7
6. Závěr	8
7. Literatura	13
8. Příloha – tab. č. 1	16

1. Úvod

Vyšetření vydechovaného vzduchu a jeho komponent má dlouhou tradici. Jedním z prvních vědců, který se touto problematikou zabýval, byl Antoine Laurent de Lavoisier (1743–1794). Přítomnost kyseliny octové, beta hydroxy máselné a acetonu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u diabetiků způsobuje typický pach dechu a je známkou dekompenzovaného diabetu. Tento symptom je znám řadu desítek let.

Konstantní poměr alkoholu krev/dech umožňuje přesnou identifikaci hladiny alkoholu v krvi analýzou vydechovaného vzduchu.

Z toho lze dedukovat, že spousta biochemických procesů v těle může být posuzována podle složení kondenzátu vydechovaného vzduchu (Jaeger, Rothe Michael, Breath condensate measurements).

Významným pokrokem ve zkoumání kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV) byl The International Meeting of American Thoracic Society (ATS) v Torontu v Kanadě 4.–10. 5. 2000, stejně tak i Annual Congress European Respiratory Society (ERS), konaný ve Florencii 30. 8. – 3. 9. 2000, které odrážely narůstající zájem o vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu. Metoda byla shledána jako užitečná pro zkoumání známek zánětu v dechových cestách a v plicích.

Během kongresu ATS zde bylo více než 30 zásadních sdělení, týkajících se problematiky dechového kondenzátu, většina z nich z dílny skupiny kolem Petra Barnse z Londýna.

Od té doby se toto vyšetření (KVV) se setkává ve světě s velkým zájmem odborné veřejnosti. KVV je bohatým zdrojem řady mediátorů a znaků zánětu sliznice dýchacích cest. Lze v něm stanovit metabolity kyseliny arachidonové, řadu proteinů (ECP, EPX, některé cytokiny, tumorózní markery), vazoaktivní peptidy, peroxid vodíku, nitrity, nitráty, nitrotyrozin, DNA aj. Tímto způsobem se nabízí významná možnost posoudit zánět a jeho intenzitu u astmatu, CHOPN a dalších onemocnění plic. Možnost vyšetření takto získaného analytu vychází z hypotézy, že aerosolové částice ve vydechutém vzduchu odráží složení bronchoalveolární extracelulární tekutiny. Standardní odběr tohoto materiálu vyžaduje zkapalnění vydechovaného vzduchu a jeho sběr do biologicky inertního prostředí. Stanovení velmi nízkých koncentrací některých ukazatelů

vyžaduje však velmi citlivé metody analýzy; nejlépe kombinaci plynové či kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. V porovnání s BAL či metodou indukovaného sputa jde o metodu neinvasivní, opakovatelnou téměř bez omezení a vhodnou pro všechny druhy nemocných včetně dětí a starších osob. Metoda umožňuje zánět detekovat ještě v bezpříznakovém období a navíc kvantifikovat jeho míru. Jedná se o novou, dynamicky se rozvíjející metodu vyšetření, orientovanou na budoucnost s praktickým dopadem pro ambulantní specialisty.

2. Cíl práce

Cílem bylo ověřit, že koncentrace vybraných potenciálních markerů onemocnění dýchacích cest v kondenzátu vydechovaného 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.

3. Přehled současných poznatků

Vyšetření vydechovaného vzduchu (KVV) se setkává ve světě s velkým zájmem odborné veřejnosti. Možnost vyšetření takto získaného analytu vychází z hypotézy, že aerosolové částice ve vydechutém vzduchu odráží složení bronchoalveolární extracelulární tekutiny.

Celá řada látek, obsažených v této tekutině představuje první linii obrany proti inhalovaným environmentálním oxidantům, jako je tabákový kouř, ozón, alergenům a mikrobiální infekci.

Jsou zde vyjádřeny změny způsobené poškozením oxidativním stresem a zánětem, pak i efekt léčby a nabízí se tak nové možnosti diagnostiky a monitoringu léčby jednotlivých plicních onemocnění.

Původ látek, nacházejících se v kondenzátu, je jednak z dutiny ústní a horních dýchacích cest, ale i z dolních dýchacích cest a alveolů.

Standardní odběr tohoto materiálu se provádí přes speciální náustek s chlopní, oddělující vdechovaný a vydechovaný vzduch. Během výdechu pak vzduch jde do sběrné nádoby, kde je zchlazen, předán do zkumavky a zmražen na -40 °C.

Stanovení velmi nízkých koncentrací některých ukazatelů vyžaduje však velmi citlivé metody analýzy; nejlépe kombinaci plynové či kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, či metodami ELISA.

Zvýšení koncentrace peroxidu vodíku bylo např. popsáno u dospělých astmatiků, v korelaci s počtem eosinofilů ve sputu. Rovněž tak byly popsány zvýšené hladiny peroxidu vodíku u kuřáků nebo během exacerbace CHOPN. Zvýšení bylo popsáno i u pacientů a ARDS.

Isoprostany jsou produkty lipidové peroxidace kyseliny arachidonové a jsou brány jako mediátory oxidativního stresu. Zvýšení LTC₄, LTD₄ a LTE₄ bylo prokázáno po expozici alergenem s následným poklesem po terapii kortikoidy.

Rovněž byly popsány zvýšené hladiny isoprostanů u pacientů a exacerbací CHOPN a kryptogenní fibrotizující alveolitidou.

V kondenzátu byly rovněž popsány zvýšené hladiny např. IL 1, IL6, TNF u řady plicních onemocnění. U kuřáků byla popsána vyšší hladina celkové bílkoviny v kondenzátu oproti nekuřákům.

Nejvíce je asi zmapována situace u nitritů, nitrátů a nitrothiosolů jako produktů metabolismu NO.

Molekula NO hraje aktivní roli v řadě plicních onemocnění, její metabolismus je poměrně složitý a hrají v něm roli enzymy – syntetázy, které se vyskytují ve 3 izoformách a zejména typ II, jehož činnost je ovlivňována řadou zánětlivých markerů, hraje klíčovou roli.

Byl ovšem popsán pokles koncentrace nitritů a nitrátů i po nižších dávkách inhalačních steroidů, takže tyto jsou brány jako více senzitivní pro diagnostiku astmatu. Výsledky u CHOPN či plicních fibrotizujících procesů jsou méně přesvědčivé.

Elevované hladiny nitritů a nitrátů byly nalezeny i v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s cystickou fibrózou v akutním i stabilizovaném stavu nebo u pacientů a aktivní formou plicní sarkoidozy.

Rovněž lze stanovit i metabolity kyseliny arachidonové, řadu proteinů (ECP, EPX, některé cytokiny, tumorózní markery), vazoaktivní peptidy, peroxid vodíku, nitrity, nitráty, nitrotyrozin, DNA aj. Tímto způsobem se nabízí významná možnost posoudit zánět a jeho intenzitu u astmatu, CHOPN a dalších onemocnění plic.

Lze říci, že od úvodní informace, že oxid dusnatý (NO) může být detekován chemiluminiscencí ve vydechovaném vzduchu u lidí (5). 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 (23), (32), u dětí (5) s atopickým průduškovým astmatem.

Endogenní NO je syntetizován během konverze L-argininu na L-citrulin, katalyzované syntetázami 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.

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 (43).

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.

4. Metodika

Studovaná skupina zahrnuje 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 a g) 18 pacientů s kryptogenní fibrotizující alveolitidou, kteří měli známky aktivity onemocnění, prokázány v BAL i HRCT vyšetřením. Nemocní neměli v době studie dosud zahájenou léčbu inhalačními nebo perorálními kortikosteroidy. Zdraví jedinci byli vybráni z personálu oddělení, či kruhu přátel.

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 popsanou dříve (18). Koncentrace IL-1beta 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.

5. Výsledky

Koncentrace dusitanů a dusičnanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu uvádí tabulka v příloze. 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 . 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-1beta 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.

6. Závěr

Nejdůležitějším závěrem této práce 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 zdravých 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 (20). 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 (19).

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 (2). Jiní autoři popisují srovnatelné hodnoty dusitanů ve vzorcích odebraných do chladičů vlastní konstrukce (30). Ve srovnání s naší studií, popsala u zdravých osob většina prací nižší koncentrace dusičnanů, výjimkou je práce autorů Corradi et al (25); (8).

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 (42). V souhlase s našimi výsledky potvrdila zvýšené koncentrace dusitanů nebo dusičnanů u nemocných s astmatem řada dalších publikovaných prací (10), (18). 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 (35). 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) (37). 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 exacerbaci 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 (42).

Nemocní s CHOPN vydechují nižší koncentrace vydechovaného NO ve srovnání s nemocnými s průduškovým astmatem před léčbou inhalačními kortikosteroidy (24). Podle závěrů mnoha studií jsou koncentrace vydechovaného NO u nemocných s klidovou CHOPN stejné jako u zdravých osob (9); (33). Jiní autoři popisují mírné zvýšení FENO, které činí maximálně dvojnásobek hodnot u zdravých osob (25), (29), (3).

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 (1).

Relativně málo studií se zaměřilo na koncentrace dusitanů a dusičnanů u nemocných s CHOPN, což může souviset s metodickými problémy vyšetření (5). 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 (8). 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

kriterii jako v předchozí studii hodnoty zvýšené nebyly (7). 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 koncentraci NO_x vliv (25). 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 (43).

Kouření komplikuje interpretaci výsledků vyšetření exhalovaného oxidu dusnatého a jeho metabolitů v kondenzátu. Snižuje koncentrace FENO u zdravých osob (31), a to v závislosti na expozici cigaretovému kouři měřené koncentrací kotininu v séru (21). Mírně snížené hodnoty FENO byly zaznamenány také u osob udávajících kouření v minulosti po dobu delší než jeden rok (21). Primárně snížené koncentrace NO u kuřáků ještě dále klesají a zůstávají nižší v intervalu 2 h po vykouření cigarety (27). Vliv pasivního kouření je u dospělých osob a dětí nejednoznačný zřejmě i z důvodu obtížného odhadu expozice (26). V práci, kterou publikovali Balint et al, měli zdraví kuřáci srovnatelné koncentrace dusitanů a dusičnanů v kondenzátu vydechovaného vzduchu jako nekuřáci minutách (2). Corradi a spolupracovníci naopak pozorovali u kuřáků více než pětinašobné zvýšení (7). Akutní nitrační a oxidační stres vyvolaný cigaretovým kouřem se projevil zvýšenými koncentracemi NO_x za 30 minut po vykouření dvou cigaret a návratem na původní hodnotu po 90 minutách (2). 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 NO_x (25). 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 (26). 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 (26).

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 (6), (5).

Koncentrace IL-1 β byly vyšší u nemocných s exacerbací CHOPN než u nemocných s klidovou CHOPN a dobře odrážely účinky protizánětlivé a antioxidační farmakoterapie (5). 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 (39). 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 (38). 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 (16).

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-1beta a IL-18 byly použitými ELISA soupravami ve většině vzorků neměřitelné.

7. Literatura

1. 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
2. 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
3. Barnes P. J., Kharitonov SA., Exhaled nitric oxide a new lung function test. *Thorax* 1996 51., 233-7
4. Barnes P. J., Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 48 1993 1034-1043
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. Delen, F.M. et al, Increased exhaled nitric oxide in chronic bronchitis. Comparison with asthma and COPD. *Chest* 117 (2000) 695-701
10. 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
11. Furukawa, K., Expression of nitric oxide synthase in human nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:847-850
12. Gao P.S. Variants of NOS 1, NOS 2 And NOS 3 genes in asthmatics *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 267 2000 761-63
13. Garvey EP., Oplinger JA., 1400W is a slow tight binding inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J. biol. Chem.* 1997 271., 4959-4963

14. Gaston, B. Relaxation of human bronchial smooth Muscle by S nitrosothiols in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1994 268 978-84
15. Gaston, B., 1998, *Lancet* 351, 1317- 1319
16. 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
17. Giles, F., Comparison of the structural and inflammatory Features of COPD and Asthma. *Chest*/117/5/May, 2000 Supplement
18. Hunt J, Byrns RE, Ignarro LJ, Gaston B. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma. *Lancet* 1995; 346:1235-1236
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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
23. Kharitonov, S.A. et al, Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 343 (1994) 133-135
24. Kharitonov, S.A., Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002; 7:1-32
25. 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
26. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 2001; 429(1-3):195-207
27. 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
28. Maziak, W. et al, Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 157 (1998) 998-1002
29. Montuschi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest*. 2001; 120:496-50

30. 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
31. 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
32. Persson MG., Zetterstrom O., Agrenius V., et. al. Single breath nitric oxide measurements in asthmatic patient and smokers. *Lancet* 1994, 343: 146-7
33. Pesci, A., Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of interleukin-8. *Chest* 1997; 112:505-510
34. Phillips., C. R Exhaled nitric oxide during exercise *J. Appl. Physiol* 80 1996 1865-71
35. 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
36. 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
37. 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
38. 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
39. 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
40. 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
41. Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax*. 2006; 61:817-27
42. 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
43. 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

Příloha – tabulka č. 1

Koncentrace dusitanů a dusičnanů v kondenzátu vydechaného vzduchu

skupina	dusitany ($\mu\text{mol/l}$)			dusičnany ($\mu\text{mol/l}$)		
	N	průměr	průměr \pm SD	N	průměr	průměr \pm SD
astma exacerbace	18	5,09	2,11 – 12,3	18	30,5	16,1 – 58,0
astma bez exacerbace	14	5,13	2,75 – 9,56	14	33,1	14,2 – 77,6
CHOPN exacerbace	18	5,26	3,17 – 8,74	16	16,6	8,67 – 31,8
CHOPN bez exacerbace	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).