

## **Конденсат выдыхаемого воздуха. подходы к диагностике заболеваний легких**

*Белорусский государственный медицинский университет, НИИ пульмонологии и фтизиатрии*

Исследование конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) является новым перспективным методом диагностики воспалительного и окислительного статуса дыхательной системы. Приведены основные методики сбора КВВ. Анализируются важнейшие компоненты этой жидкости, способные служить маркерами воспаления и окислительного стресса при различной патологии. Обозначены клинические проблемы, которые возможно решить с помощью метода анализа КВВ. Рассмотрена возможность исследования КВВ у пациентов, находящихся на ИВЛ, для определения риска развития ОРДС. Ключевые слова легкие, воспаление, искусственная вентиляция, оксид азота, цитокины, эйкозаноиды, лейкотриены, перекись водорода, аммиак.

Exhaled breath condensate. Approach for diagnostics of lung diseases  
Exhaled breath condensate (EBC) analysis is a new perspective method of diagnostics of the inflammatory and oxidizing status in respiratory system. In this review the basic procedures of the EBC collecting are given. The changes of markers of inflammation and oxidizing stress in different pathology are reviewed. We present the current body of knowledge on clinical problems, which are possible for solving with a method of the EBC collecting. The possibilities of EBC analysis of patients with mechanical ventilation for risk determination of ARDS development are reviewed.

Keywords: lung, inflammation, mechanical ventilation, nitric oxide, cytokines, eicosanoids leukotrienes, hydrogen peroxide, ammonia.

В последнее время во всех сферах клинической медицины нарастает интерес к исследованию конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ). Сбор КВВ является первым методом в пульмонологии, который сам по себе не оказывает влияния на собираемые образцы. Его с легкостью можно проводить у детей, тяжело больных и пациентов, находящихся на ИВЛ.

Биологические молекулы попадают в КВВ из бронхиального и альвеолярного аэрозолей, которые формируются при испарении жидкости, прилежащей к эпителиальной выстилке. Эта жидкость является границей раздела между клетками респираторного тракта и внешней средой.

Сбор КВВ осуществляется с помощью конденсора, который представляет собой устройство, основанное на принципе противотока. В исследованиях используют как самодельные конденсоры, так и коммерческие модели (Jaeger, ФРГ; Rtube, ФРГ). В качестве охлаждающего компонента применяются тающий лед, этанол, жидкий азот, замороженные металлические трубки.

Для определения точного состава КВВ имеет значение материал, из которого сделан контейнер и его адгезивные свойства. Это важно для исследования в КВВ белков и липидов. Так известно, что гидрофобность поверхности влияет

на адсорбцию белков. Полагают, что гидрофобные взаимодействия доминируют в процессе адсорбции белков, она увеличивается, если растет степень гидрофобности поверхности или белка. Поэтому, если планируется сбор КВВ для определения белков, то необходимо использовать более гидрофильные стеклянные конденсорные системы. Для определения липидов предпочтительнее конденсоры из полипропилена (8).

#### Состав КВВ

В составе КВВ на сегодняшний день обнаружено более 200 соединений. Однако большинство из этих веществ можно определить только с помощью высокоточных аналитических методов. Наилучшим методом является жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией. Не каждая лаборатория, особенно в странах СНГ, может позволить себе это. Поэтому из большого количества биомаркеров, обнаруженных в КВВ, рутинно определяют достаточно небольшую группу соединений. Для измерения в КВВ быстроразрушаемых молекул, таких как NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, требуется их быстрое определение непосредственно во время сбора КВВ путем мониторинга (NO и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-анализаторы).

Азотсодержащие соединения: оксид азота, нитриты, нитраты, S-нитротиолы, нитротирозин.

Оксид азота NO является наиболее интенсивно изучаемым маркером в выдыхаемом воздухе. Описаны его изменения при различных заболеваниях, хорошо известна его информативность для прогнозирования течения бронхиальной астмы.

В дыхательной системе выделяют ферментные и неферментные источники NO. В случае ферментного его происхождения исходным субстратом является L-аргинин, а ферментом, катализирующим его превращение, выступает NO-синтаза. Этот фермент существует в трех изоформах. Две из этих изоформ синтезируются постоянно (конститутивно) и активируются незначительными повышениями концентрации внутриклеточного кальция. Третий фермент – индуцируемая NO-синтаза (iNOS, NOS2) – имеет намного большую по сравнению с ее изоформами активность. Она не зависит от концентрации внутриклеточного кальция, активируется цитокинами, эндотоксинами, вирусными частицами и отражает силу воспалительного процесса. Свидетельством того, что выдыхаемый оксид азота NO, в основном, является продуктом работы NOS2, служит то, что кортикостероиды ингибируют NOS2 в эпителиальных клетках, уменьшают ее активность в биоптате бронхов больных астмой, одновременно понижается концентрация выдыхаемого NO (11).

Вторым значительным источником оксида азота являются его связанные формы. В жидкости, выстилающей эпителий, содержится большое количество тиол-содержащих молекул, таких как цистеин, глутатион. NO связывается с ними и формирует S-нитротиолы и S-нитрозопротеины. По некоторым оценкам от 70 до 90% NO сосредоточено в S-нитротиолах, которые являются главным источником NO в тканях (19).

Появление NO в выдыхаемом воздухе также может быть связано с протонированием нитритов в кислой среде. Нитриты образуют азотистую кислоту, которая высвобождает газообразный NO. Такой pH-зависимый

механизм замечен во время обострения астмы, когда в КВВ обнаруживается снижение рН (8).

Оксид азот NO синтезируется во всех отделах дыхательной системы. Бронхиальные клетки секретируют NO в просвет дыхательных путей, где он смешивается с альвеолярным NO во время выдоха, что приводит к усреднению его концентрации в выдыхаемом воздухе. Прямое определение NO в трахее и главных бронхах с помощью бронхоскопии, а также опыты с ингибированием NOS показали, что основное количество NO синтезируется в нижних дыхательных путях и, скорее всего, этот процесс происходит в эпителиальных клетках (15).

**Перекись водорода**

Перекись водорода образуется из радикалов кислорода, которые выделяют активированные клетки воспаления: нейтрофилы, макрофаги, эозинофилы. Перекись водорода менее активна, чем другие радикальные формы кислорода, поэтому она относительно слабо реагирует с компонентами биологических мембран, продвигаясь мимо них в экстрацеллюлярное пространство и жидкость, прилежащую к эпителиальной выстилке (4). Однако внеклеточная антиоксидантная система защиты обладает существенно более низкой способностью инактивировать радикальные формы кислорода и перекись по сравнению с внутриклеточной. Основным компонентом этой системы, участвующим в катаболизме перекиси, является каталаза, которая представлена в выстилающей жидкости в малых концентрациях. Поэтому перекись водорода обнаруживается в КВВ и является потенциальным маркером окислительного стресса в легких.

**Эйкозаноиды**

Все эйкозаноиды образуются из общего предшественника – арахидоновой кислоты, которая относится к полиненасыщенным жирным кислотам. Сюда входят четыре основных группы соединений: простагландины (ПГ), простаглицлины, тромбоксаны и лейкотриены (ЛТ).

Эйкозаноиды обладают широким спектром биологической активности. Они являются потенциальными медиаторами воспаления, ответственными за вазомоторные реакции, эксудацию плазмы, секрецию слизи, сужение и расширение бронхов. Исследование КВВ позволяет оценивать профиль эйкозаноидов в легких, в том числе при применении антагонистов лейкотриенов или ингибиторов тромбоксана.

**Простаноиды:** Имеются данные об увеличении активности ключевого фермента при синтезе ПГ, простаглицлинов и тромбоксанов - индуцируемой циклооксигеназы (COX-2) при астме, хронических обструктивных заболеваниях легких (ХОЗЛ) и муковисцидозе. Большинство ПГ, простаглицлинов и тромбоксанов усиливают воспаление, но ПГ-E2 и ПГ-I2 обладают противовоспалительным действием. Например, ПГ-E2 ингибирует NOS2 в клеточных культурах и уменьшает концентрацию выдыхаемого NO во время его ингаляции при астме (10). Уровень простаглицлинов ПГ-E2 и ПГ-F2 в КВВ значительно повышен у пациентов с ХОЗЛ, но не отмечено подобных изменений при астме (11). Наоборот, уровень тромбоксана В2 увеличен при астме, но не определяется у здоровых пациентов и людей, страдающих ХОЗЛ (22).

Лейкотриены: Цистеинил-лейкотриены ЛТ-С4, ЛТ-Д4 и ЛТ-Е4 секретируются в основном эозинофилами, отвечают за состояние гладкой мускулатуры дыхательных путей, вызывают экссудацию плазмы, секрецию слизи, миграцию и активацию эозинофилов. ЛТ-В4 обладает способностью активировать нейтрофилы (13). Сообщается, что измеряемые уровни ЛТ-В4, С4, Д4, Е4 и F4 в КВВ обнаруживались у здоровых пациентов, больных астмой и ХОЗЛ. При астме наблюдалась зависимость между тяжестью заболевания, приемом глюкокортикоидов и концентрацией лейкотриенов В4, С4, Д4, Е4 в КВВ.

Изопростаны: Это новый подкласс простаноидов, которые образуются при перекисном окислении арахидоновой кислоты. Первоначально они присутствуют в составе фосфолипидов мембран, из которых высвобождаются фосфолипазой А2, циркулируют в плазме, экскретируются с мочой и могут быть обнаружены в КВВ и бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Основными кандидатами для клинического измерения окислительного стресса являются F2-изопростаны. Они стабильны, определяются во всех биологических жидкостях и тканях, их количество увеличивается при системном окислительном стрессе, например у пациентов с сахарным диабетом и острым респираторным дистресс – синдромом (ОРДС) (2). Изопростаны выступают не только в роли маркеров перекисного окисления липидов, но также проявляют биологическую активность и могут быть медиаторами окислительного стресса. Они отражают комплексные взаимодействия между радикалами кислорода и азота. Пероксинитрит способен активировать биосинтез тромбоксана и окисление арахидоновой кислоты до F2-изопростанов. Преобладающим изопростаном является 8-эпи-ПГ-F2?, часто называемый 8-изопростаном (14).

Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ)

Определение ПОЛ, наряду с измерениями перекиси водорода, азотсодержащих соединений и изопростанов в КВВ может дать важную информацию об окислительном статусе в дыхательной системе. Наиболее простым, но неспецифичным методом является измерение продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Было найдены существенно повышенные концентрации первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (кетодиены) продуктов ПОЛ в КВВ и образцах бронхиопсии у пациентов с ХОЗЛ и хроническим бронхитом по сравнению со здоровыми людьми (12).

Аммиак

Аммиак является продуктом гидролиза мочевины. Многие бактерии вырабатывают уреазу, которая гидролизует мочевину до аммиака. В дыхательных путях аммиак способен нейтрализовать вдыхаемые капли кислот и аэрозолей, уменьшая легочные эффекты поллютантов. Он способен также регулировать активность NOS. Уровень аммиака в КВВ значительно повышен у пациентов с астмой и заболеваниями верхних дыхательных путей (9). Определение уровня аммиака в КВВ может использоваться для дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных заболеваний легких.

Электролиты

Имеются сообщения о том, что при atopической астме в КВВ понижается концентрация магния и повышается уровень кальция (5). При муковисцидозе

наблюдается повышение Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup>, концентрация которых коррелирует с тяжестью заболевания. Показана также строгая обратная взаимосвязь между концентрацией Cl<sup>-</sup> в мокроте и NO в выдыхаемом воздухе у пациентов с синобронхиальным синдромом, свидетельствующая о том, что изменения в мукоциллиарном клиренсе могут отслеживаться с помощью измерения уровня Cl<sup>-</sup> в КВВ и NO в выдыхаемом воздухе (20).

Белки, пептиды, цитокины.

Идентификация и измерение концентрации белков в конденсате вызывает серьезные споры. Сообщалось, что количество белка в КВВ у здоровых добровольцев колебалось в пределах от 1,4 до 4 мг и включало в себя IL-1?, растворимый рецептор к IL-2, IL-6, и TNF-? (30). Высокие концентрации общего белка были обнаружены также в КВВ молодых курильщиков по сравнению с некурящими, в то время как уровни IL-1? и TNF-? не отличались (6). Невыясненным остается происхождение этих белков – носоглотка, ротоглотка или нижние дыхательные пути. В КВВ у интубированных пациентов обнаружено присутствие IL-6 и IL-8. Это свидетельствует о том, что какая-то часть цитокинов образуется в нижних дыхательных путях и бронхах.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что метод сбора КВВ и определения в нем биомаркеров может применяться для диагностики различных заболеваний дыхательной системы. Информация об основных показателях КВВ и их изменения в КВВ при различной патологии приведены в таблице 1.

Патология	Показатели												
							Эйкозаноиды						
	NO	NO <sub>2</sub> /NO <sub>x</sub>	SNO	NT	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	8-изопростан	LT-E <sub>4</sub> , C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub>	LT-B <sub>4</sub>	ПГ	Тх	ЦК	электролиты
Бронхиальная астма:													
стабильная	↑↑↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	?	?	↑	Mg↓, Ca↓
нестабильная	↑↑↑↑	↑↑	↓	?	↑↑	?	↑↑↑	↑↑	↑↑	?	?	?	
ХОЗЛ	↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑	?	↑	↑	↑↑↑	?	?	?	
ИЗЛ	↑	?			?	?	↑↑	?	?	?	?	↑	
Бронхоэктазы	↑	?			↑	?	?	?	?	?	?	?	
Муковисцидоз	↓	↑↑	↑↑	↑↑	?	?	↑↑↑	?	?	?	?	?	Na↑, Cl↑

Конденсат выдыхаемого воздуха и механическая вентиляция легких.

Искусственная вентиляция является нефизиологичным процессом. До сих пор не определены величины дыхательного объема, давления и FIO<sub>2</sub> (парциального давления кислорода во вдыхаемой смеси), которые легкие переносят “безболезненно”. В результате, в процессе искусственной вентиляции часто возникают или усиливаются повреждения лёгкого, проявляющиеся двояко: обширной баротравмой или паренхиматозным поражением, сходным с ОРДС. Величины пикового давления и объема, при которых вероятность развития баротравмы велика, неизвестны. Исследования на животных показывают, что повреждение легочной паренхимы при ИВЛ возрастает с ростом амплитуды движения альвеолярной стенки.

Механизм спадания и повреждения альвеол связывают с перераспределением сурфактанта. Альвеолы здоровой легочной паренхимы в конце выдоха сжимаются, а молекулы сурфактанта остаются между их стенками. Это ведет к резкому снижению поверхностного натяжения или повышению поверхностного давления, что предотвращает спадание альвеол. Если поверхность альвеол становится меньше, чем общая площадь молекул сурфактанта, то происходит “выдавливание” последних в воздухоносные пути, а альвеолы, таким образом, остаются “беззащитными”. При последующем вдохе “выдавленный” сурфактант возвращается обратно, а при выдохе вновь покидает альвеолярный объем, далее все повторяется. В конце концов, повышенное поверхностное натяжение в альвеолах вызывает их экспираторный коллапс с развитием ателектазов и зон гиповентиляции (18).

Вторым важным фактором, оказывающим влияние на состояние дыхательной системы в ходе ИВЛ, является  $\text{FIO}_2$ . Общеизвестна роль кислорода в запуске свободнорадикальных реакций и развитии окислительного стресса в дыхательных путях. Повышенная концентрация кислорода во вдыхаемой смеси будет усиливать повреждающее действие неадекватно высокого или несбалансированного дыхательного давления и объема.

Несмотря на столь четкие представления о механизме повреждения до сих пор нет критериев для определения предельно безопасных пикового и среднего альвеолярного давления, дыхательного объема и  $\text{FIO}_2$ , которые бы использовались при ИВЛ без увеличения легочного повреждения или задержки выздоровления. Врачи применяют лишь эмпирическое манипулирование этими параметрами, руководствуясь изменениями в газовом составе выдыхаемого воздуха и крови.

В разработке столь необходимых критериев у больных с ИВЛ весьма перспективным представляется исследование КВВ. Это единственный метод диагностики, который позволяет оценивать воспалительный процесс в легких на любом этапе ИВЛ, не ухудшая при этом состояния пациента. Как оказалось, маркеры воспалительного процесса изменяются у больных, прооперированных с применением интубационного наркоза. Так, было установлено, что режимы вентиляции с использованием большого объема и низкого положительного давления в конце выдоха связаны с увеличением альвеолярного уровня цитокинов (17). В других исследованиях была обнаружена зависимость между уровнем нитритов в КВВ и дыхательным объемом при механической вентиляции (7).

Возможность исследования КВВ у пациентов с риском развития ОРДС может служить важнейшим прогностическим критерием, т.к. другие методы диагностируют развившийся дистресс-синдром на поздних стадиях. В патогенезе ОРДС большое внимание уделяют значению нитрооксидергических механизмов. Высказывалось мнение, что ключевую роль в развитии ОРДС может играть iNOS, пероксинитрит, а также нитротирозин (1). И действительно, исследование метаболизма азота у интубированных пациентов с ОРДС установило понижение уровня NO в выдыхаемом воздухе. Помимо этого у пациентов с риском развития ОРДС наблюдалось также повышение концентрации перекиси водорода (21) и уровня 8-изопростана (3).

Эти данные свидетельствуют о целесообразности продолжения работы в этом направлении. Причем конечная цель, видится, в установлении закономерностей изменения уровня медиаторов воспаления в КВВ больных, находящихся на ИВЛ и в выяснении взаимосвязи их с концентрацией кислорода в ингаляционной смеси, дыхательным объемом и давлением. Такой подход, вполне вероятно, позволил бы предложить объективные критерии определения степени риска развития ОРДС и прогнозирования его течения.

#### Литература

1. Brett S.J., Evans T.W. Measurement of endogenous nitric oxide in lungs of patients with the acute respiratory syndrome. *Amer. J. Respirat. Crit. Care.* - 1998. - Vol.157, N3. - P.993-997.
2. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998; 114: 1653-1659
3. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998; 114: 1653-1659
4. Dohlman AW, Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 955-960
5. Emel'ianov AV, Petrova MA, Lavrova OV, Guleva LI, et al. Disorders in mineral metabolism at different stages of the development of bronchial asthma. *Ter Arkh* 1995; 67: 45-47.
6. Garey KW, Neuhauser MM, Rafice AL, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Protein, nitrite/nitrate, and cytokine concentration in exhaled breath condensate of young smokers [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: A175
7. Gessner C, Hammerschmidt S., Kuhn H., Lange T., Engelmann L., Schauer J., and Wirtz H . Exhaled breath condensate nitrite and its relation to tidal volume in acute lung injury. *Chest* 2003; 124:1046–1052)
8. Gүkhan M. Mutlu, Kevin W. Garey, Richard A. Robbins, Larry H. Danziger, and Israel Rubinstein. Collection and Analysis of Exhaled Breath Condensate in Humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Volume 164, Number 5, September 2001, 731-737
9. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled ammonia in asthma, cystic fibrosis and upper respiratory tract infection [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: A307
10. Kharitonov SA, Sapienza MA, Barnes PJ, Chung KF. Prostaglandins E2 and F2 reduce exhaled nitric oxide in normal and asthmatic subjects irrespective of airway caliber changes. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1374-1378
11. Kharitonov SA, Yates DH, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133-135
12. Khyshiktuev BS, Khyshiktueva NA, Ivanov VN. Methods of measuring lipid peroxidation products in exhaled air condensate and their clinical significance. *Klin Lab Diagn* 1996;13-1
13. Larfars G, Lantoin F, Devynck MA, Palmblad J, Gyllenhammar H. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B4, C4, and D4 in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1999; 93: 1399-1405

14. Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, Packer L, Jialal I. Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1114-1121
15. Massaro AF, Mehta S, Lilly C et al. Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1510-1514
16. Montuschi P, Kharitonov SA, Carpagnano E, Culpitt SV, Russell R, Collins JV, Barnes PJ. Exhaled prostaglandin E2: a new biomarker of airway inflammation in COPD
17. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 282: 54-61
18. Roupie E., Dambrosio M., Servillo G., , et al. Titration of tidal volume and induced hypercapnia in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:121—8.
19. Sheu FS, Zhu W, Fung PC. Direct observation of trapping and release of NO by glutathione and cysteine with electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biophys J* 2000; 78: 1216-1226
20. Tamaoki J, Taira M, Nishimura K, Impairment of airway mucociliary transport in patients with sinobronchial syndrome: Role of nitric oxide. *J Aerosol Med* 2000; 13: 239-244
21. Wilson WC, Swetland JF, Benumof JL, Laborde P, Taylor R. General anesthesia and exhaled breath hydrogen peroxide. *Anesthesiology* 1992; 76: 703-710
22. Yamada T., Yukioka H., Hayashi M. et al. Effects of inhaled nitric oxide on platelet - activating factor-induced pulmonary hypertension in dogs. *Acta Anesth. Scand.* 1998. vol. 42, N3. P.358-368