

Э.Х.Анаев, А.Г. Чучалин

**ИССЛЕДОВАНИЕ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА
В ПУЛЬМОНОЛОГИИ (ОБЗОР ЗАРУБЕЖНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ)**

НИИ пульмонологии Минздрава РФ, Москва

Традиционные методы сбора секрета из нижних отделов дыхательных путей включают сбор мокроты, индуцирование мокроты и бронхоскопию с последующим бронхоальвеолярным лаважем (БАЛ). В настоящее время бронхоскопия с взятием БАЛ стала предпочтительным методом сбора образцов слизистой нижних отделов респираторного тракта. В последние годы ведется поиск менее инвазивных методов, которые легче использовать у амбулаторных пациентов, особенно у детей. В последнее время растет интерес к использованию выдыхаемого воздуха как к простому неинвазивному методу для получения образцов из нижних отделов дыхательных путей [40,54].

Бронхиальный секрет дистальных отделов респираторного тракта содержит несколько нелетучих и более 200 летучих соединений [45,63]. Хотя изначальные попытки были направлены на то, чтобы идентифицировать летучие субстанции, особенно оксид азота (N₂O), в настоящее время исследования ведутся для того, чтобы определить нелетучие макромолекулярные соединения, присутствующие в выдыхаемом воздухе, включая протеины, липиды, оксиданты и нуклеотиды. Эти макромолекулы представляют собой биомаркеры различных патологических процессов, происходящих в легких. Для анализа нелетучих субстанций требуется конденсация выдыхаемого воздуха путем его охлаждения.

В этом обзоре мы представляем состояние проблемы по конденсату выдыхаемого воздуха (КВВ) в настоящее время. Мы обращаем внимание на использование этого метода для определения степени воспалительной реакции.

Сбор конденсата выдыхаемого воздуха

Выдыхаемый воздух насыщается водяными парами, которые могут быть конденсированы при охлаждении. Хотя большая часть конденсата состоит из водяного пара, он также содержит различные частицы из дыхательных путей. Существуют единичные доказательства, позволяющие предположить, что нелетучие субстанции нижнего отдела дыхательных путей могут быть перенесены в форме аэрозоля в выдыхаемый воздух. Когда выдыхаемый воздух поступает в сборник при температуре -196°C и высушивается при замораживании, аэрозоль осаждается и становится видимым как белые частицы. Сравнение содержания протеинов между замороженными аэрозольными частицами и образцами слюны показывает, что добавочные протеины присутствуют в аэрозольных частицах, но не в слюне. Это позволяет предположить, что нелетучие субстанции, такие как протеины, из нижних дыхательных путей могут переноситься в выдыхаемый воздух в форме аэрозоля [63]. Важной задачей, которая должна быть решена, является определение источника происхождения аэрозольных частиц (дыхательные пути или альвеолы), которые несут в себе эти протеины. Последние исследования показали, что крупные дыхательные пути являются источником большей части выдыхаемой перекиси водорода (H_2O_2), и это основывается на зависимости концентрации H_2O_2 от воздушного потока [64]. Исследования, которые используют протеины, имеющие отношение к сурфактанту, или специфические маркеры, продуцируемые клетками альвеол (например, плацентарная щелочная фосфатаза) или бронхиолами, подтверждают клеточный источник аэрозолей и макромолекул [63].

При нормальном дыхании уровень аэрозольных частиц колеблется между 0,1 и 4 частицами на 1 см^3 . Средний диаметр этих частиц меньше 0,3 мкм [23]. Количество аэрозолей, формирующихся в дыхательных путях, зависит от скорости воздушного потока и поверхностного натяжения внеклеточной выстилки. Чем выше скорость потока и меньше поверхностное натяжение, тем больше продукция аэрозолей. Баланс между низкой скоростью и высоким поверхностным натяжением, который обнаруживается на уровне альвеол, определяет продукцию аэрозоля. Кроме того, турбулентные потоки облегчают формирование аэрозоля. Прохождение воздуха через систему охлаждения приводит к ее конденсации. Таким образом, становится возможным сбор выдыхаемого воздуха в жидкой форме. Конденсация выдыхаемого воздуха может быть достигнута путем простого ох-

лаждения трубки, в которую пациент дышит (рис.1). Было показано, что КВВ можно собрать при помощи приспособлений различного дизайна. Наиболее широко используется конденсирующая система, представленная трубкой с тефлоновым покрытием, помещенная в стеклянную емкость с двойными стенками, заполненную льдом. Конденсирующие камеры включают контейнеры, состоящие из стекла, полистирена или полипропилена. В настоящее время наиболее часто используется конденсатор (*"Erich Jaeger GmbH"*, Германия).

На состав КВВ может влиять материал, из которого сделан контейнер. Когда планируется анализ биологически активных липидов, для сбора конденсата необходимо использовать полипропиленовый контейнер, чтобы избежать проблем адсорбции с контейнером из полистирена. Охлаждения выдыхаемого воздуха можно достичь при помощи жидкого льда, также как и при помощи сухого льда или жидкого азота. Полное закрытие собирательной трубки может произойти из-за очень низких температур, когда жидкий азот и сухой лед используются для охлаждения выдыхаемого воздуха. Это очень важное обстоятельство, особенно при сборе выдыхаемого воздуха от пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ). Если его не соблюдать, это может привести к серьезным последствиям (например, к динамической гиперинфляции). Использование жидкого льда или более длинной коллекторной трубки может снизить частоту возникновения этого осложнения. Тем не менее сухой лед или жидкий азот предлагаются для анализа субстанций, которые нестабильны при температуре от -5 до 5°C (например, лейкотриены) [54].

Пациенту рекомендуется спокойно дышать в трубку или через мундштук, соединяющийся с трубкой. Никаких носовых зажимов не рекомендуется, потому что их применение открывает носоглоточный клапан. Таким образом, происходит контаминация выдыхаемого воздуха с носовым воздухом. Во всех исследованиях пациенты дышали спокойно. Напротив, *Но и соавт.* предлагали исследуемым сделать глубокий вдох перед выдохом [30]. Коллекторная система также может быть соединена с пациентом, находящимся на ИВЛ, через экспираторную часть вентиляционной трубки.

Несмотря на отсутствие абсолютных противопоказаний для сбора КВВ, его не следует проводить в течение недели после бронхоскопического исследования, 3 дней после теста со специфическими или неспецифическими аллергенами (проба с гистамином или метахолином), а также в течение 10 мин после проведения спирометрии.

Обычно процедура занимает 10-15 мин у взрослых и 15-20 мин у детей, чтобы получить 1-3 мл конденсата. Количество конденсата, получаемого при выдохе, различается у пациентов. Минутная вентиляция остается основным определяющим фактором количества конденсата, получаемого за единицу време-

ни, и она совершенно не влияет на уровень измеряемых субстанций [65]. Хотя это заключение нельзя обобщить для всех биомаркеров, концентрация H_2O_2 в выдыхаемом воздухе является величиной, зависящей от потока воздуха [64]. Влажность выдыхаемого воздуха может быть важным определяющим фактором скорости формирования КВВ. Бронхиальное кровообращение является основным фактором, определяющим увлажнение вдыхаемого воздуха [46]. Обладая двумя взаимосвязанными венозными сплетениями (одно сразу под бронхиальным эпителием, второе — глубоко в перибронхиальной соединительной ткани), бронхиальное дерево является идеальной системой для согревания и увлажнения воздуха. У животных бронхиальное кровообращение меняется с изменением влажности и температуры вдыхаемого воздуха [7]. Таким образом, вдыхание сухого воздуха увеличивает бронхиальный кровоток у людей [2].

Так как большинство субстанций (например, нитриты) измеряются во всех отделах респираторного тракта, включая и носовые ходы, предотвращение смешивания выдыхаемого воздуха является важным шагом к получению правильного образца. Если уровень данной субстанции (например, H_2O_2 или нитрита) достаточно высок в слюне, он может контаминировать образец и изменить его интерпретацию. Предотвратить попадание слюны можно использованием уловителя слюны, а для предотвращения контаминации достаточно прополоскать рот перед сбором образца или проглотить аккумулирующуюся слюну для сохранения полости рта сухой во время сбора конденсата. Кроме того, направляющий клапан в мундштуке также используется как уловитель слюны. Тем не менее при попытке полностью исключить контаминацию образца следует тестировать на присутствие амилазы слюны. Когда такие меры приняты, капли выдыхаемого аэрозоля должны отражать содержание внеклеточной жидкости, покрывающей нижние дыхательные пути.

Соединения, присутствующие в КВВ

В настоящее время анализ КВВ является областью для активных исследований. Следовательно, новые макромолекулы добавляются к списку соединений, которые можно определять в КВВ. В табл.1 приведены соединения, определяемые в настоящее время.

Курильщики

Уровень H_2O_2 , продукта окислительного метаболизма и меры окислительной активности в тканях, в КВВ измеряли у курильщиков по сравнению со здоровым контролем. У курильщиков уровень H_2O_2 в выдыхаемом воздухе в 5 раз выше, чем у некурящих. Также было отмечено, что курильщики мужчины выдыхали больше H_2O_2 , чем курильщики женщины

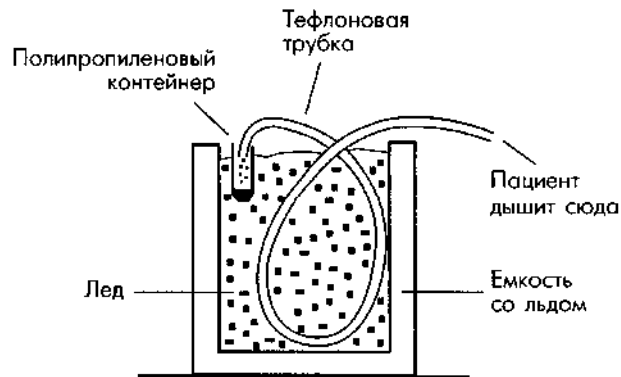


Рис.1. Схематическое изображение системы для сбора конденсата.

[56]. В другом исследовании *Nowaki соавт.* выявили, что концентрация H_2O_2 в КВВ у здоровых курильщиков в 2,4 раза выше, чем у некурящих, и снижается до нормальных значений через 2 нед после отмены курения [57]. Удаление H_2O_2 антиоксидантной системой, которая также активизируется при курении, может объяснить отсутствие корреляции между экспозицией к сигаретному дыму и уровнем H_2O_2 в КВВ. Недавно проведенные исследования показали, что уровень H_2O_2 в КВВ у курильщиков увеличивается через полчаса после употребления одной сигареты [26,57]. Измерение H_2O_2 или других маркеров окислительного стресса в КВВ можно использовать для выявления субъектов с более высоким риском развития болезней легких, связанных с курением, при помощи фиксирования усиленной продукции реактивных форм кислорода.

Бронхиальная астма

В КВВ присутствует большое количество различных маркеров воспаления, которые исследуются как возможные биомаркеры активности болезни. Наиболее часто исследуют H_2O_2 . *Antzack и соавт.* обнаружили увеличение уровня H_2O_2 и кислотно-реактивных соединений тиобарбитуровой кислоты (маркера перекисного окисления липидов) у пациентов с бронхиальной астмой (БА) по сравнению со здоровыми людьми. Они также зафиксировали высокую положительную корреляцию между уровнями H_2O_2 и соединений тиобарбитуровой кислоты. Кроме того, важно отметить, что увеличение уровня H_2O_2 у больных БА было связано со снижением значения объема форсированного выдоха за 1-ю секунду ($ОФВ_1$) [3]. Подтверждая эти наблюдения, *Antzack и соавт.* в двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании продемонстрировали значительное уменьшение уровня H_2O_2 в выдыхаемом воздухе у пациентов с БА, которые получали лечение ингаляционными кортикостероидами (КС), по сравнению с плацебо [5]. Как и в предыдущем исследовании, была негативная корреляция между уровнем H_2O_2 и

Медиаторы воспаления, обнаруживаемые в КВВ при различных заболеваниях легких

Состояния	Субстанции
Курильщики	H_2O_2 , 8-изопростан
Хроническая обструктивная болезнь легких	H_2O_2 , 8-изопростан, серотонин, лейкотриен В ₄ , цитокины (интерлейкин-1, растворимый рецептор интерлейкина-2, фактор некроза опухоли α)
Бронхиальная астма	H_2O_2 , 8-изопростан, нитротирозин, рН, кислотно-реактивные соединения тиобарбитуровой кислоты, лейкотриены, гистамин
Хронический бронхит	Лейкотриены
Бронхоэктазы	H_2O_2 , лейкотриен В ₄ , 8-изопростан
Муковисцидоз	H_2O_2 , нитриты, 8-изопростан, интерлейкин-8, электролиты
Респираторный дистресс-синдром взрослых	H_2O_2 , 8-изопростан, рН, простагландин Е ₂
Интерстициальные заболевания легких	H_2O_2 , 8-изопростан, нитриты/нитраты, цитокины (интерлейкин-1, растворимый рецептор интерлейкина-2, фактор некроза опухоли α)

ОФВ₁ на 29-й день лечения. Интересно отметить, что уровень H_2O_2 был стабильным в течение 2 нед после прекращения ингаляции КС. *Horvath и соавт.* продемонстрировали, что концентрация H_2O_2 в КВВ больных как со стабильной, так и нестабильной БА, принимающих системные КС, и пациентов, находящихся на монотерапии β_2 -агонистами, была достоверно выше, чем у здоровых людей [31]. Уровень H_2O_2 в КВВ также повышен у детей со стабильной БА по сравнению со здоровыми детьми [36]. Важно отметить, что уровень H_2O_2 коррелировал с тяжестью заболевания и был ниже у детей, получающих лечение противовоспалительными препаратами [21]. Таким образом, становится очевидным, что H_2O_2 может быть простым и полезным биомаркером воспаления дыхательных путей у детей и взрослых с БА, особенно при мониторинговании эффекта противовоспалительной терапии.

Другие медиаторы воспаления, получаемые при оксидантной и пероксидазной активности, привлекли значительное внимание как полезные биомаркеры у пациентов с БА. *Hanazawa и соавт.* сравнили уровень нитротирозина, стабильного конечного продукта оксиданта пероксинитрита, в КВВ у больных БА с разной степенью тяжести заболевания по сравнению с некурящими здоровыми [27]. Уровень выдыхаемого нитротирозина был увеличен у больных с легкой БА по сравнению с контрольной группой, но ни у пациентов со среднетяжелой или тяжелой БА, получающих терапию КС. Напротив, уровень пероксинитрита был стабильным, но был увеличен уровень цистеиновых лейкотриенов (ЛТ С₄/D₄/E₄), который не реагировал на КС-терапию. В другом исследовании уровень нитрита, стабильного конечного продукта метаболизма NO, у больных БА был в

3 раза выше по сравнению со здоровым контролем [32]. *Ganas и соавт.* также показали, что уровень нитритов/нитратов в КВВ достоверно повышен у больных atopической БА по сравнению со здоровыми и позитивно коррелировал с концентрацией H_2O_2 [24]. Антиоксидантный ответ при БА был исследован при помощи нитрозотиола, образующегося в результате реакции между NO и антиоксидантным ответом (например, глутатион) [16]. Уровень выдыхаемого нитрозотиола был повышен у больных с тяжелой БА по сравнению с пациентами легкой БА и здоровыми субъектами, что можно использовать для оценки степени тяжести заболевания. *Hanazawa и соавт.* обнаружили, что уровень нитротирозина значительно повышается у больных среднетяжелой и тяжелой БА после отмены КС, что коррелировало со снижением ОФВ₁ [27].

В последнее время изопростаны, продукты перекисного окисления арахидоновой кислоты, также были исследованы в КВВ больных БА как биомаркеры воспаления [62]. Они относительно стабильны и специфичны для пероксидации липидов, что делает их потенциально убедительными биомаркерами оксидативного стресса [53]. Наиболее часто исследуемым является 8-изопростан, принадлежащий к классу изопропанов F₂. Исследование, проведенное у пациентов с легкой, среднетяжелой или тяжелой БА, выявило увеличение уровня 8-изопростана в КВВ по сравнению со здоровыми людьми [51]. Даже у пациентов с легкой БА уровень 8-изопростана был в 2 раза больше по сравнению со здоровыми, а у пациентов с тяжелой БА еще выше, независимо от дозы используемых КС. Различия между легкой и среднетяжелой БА не были статистически достоверны. Также не было корреляции между уровнем изопрос-

тана-8 и легочной функцией у пациентов с различной степенью тяжести заболевания.

Точно установлено, что лейкотриены играют важную роль в патофизиологии БА, вызывая сокращение гладкой мускулатуры, повышение сосудистой проницаемости и гиперсекрецию слизи. Исследования, проведенные в последние годы, показали увеличение уровня цистеиновых лейкотриенов и ЛТ В₄ в КВВ у пациентов с БА по сравнению со здоровой контрольной группой [28]. Уровень лейкотриенов повышается с утяжелением БА. Однако не было корреляции между этими медиаторами и уровнем ОФВ₁ у пациентов с тяжелой и среднетяжелой БА. *Blankenburg и соавт.* показали, что концентрация ЛТ В₄ у больных атропической БА была достоверно выше, чем у здоровых [13]. В других исследованиях уровень ЛТ В₄ в КВВ увеличивался с утяжелением БА у взрослых и детей [12,17]. Было обнаружено, что концентрация ЛТ В₄ была в 9 раз выше у пациентов с тяжелой БА по сравнению с больными легкой астмой [12]. Однако не было корреляции между уровнем ЛТ В₄ и ОФВ₁. *Bucchioni и соавт.* обнаружили значимое уменьшение концентрации гистамина в КВВ после теста с метахолином у больных легкой БА [14]. *Hunt и соавт.* использовали КВВ для определения рН в выдыхаемом воздухе у пациентов с БА и контрольной группе [33]. В этой группе значение рН было сравнимо с тем, которое определяется в мокроте и было сходно с рН в БАЛ [1,47]. В исследовании, проведенном *Kostikas и соавт.*, выявлено, что уровень рН меньше у больных БА по сравнению с контролем и коррелирует с концентрацией нитритов/нитратов. Обострение БА было связано со снижением рН на 2 логарифмических порядка по сравнению с контрольной группой [42]. Важно отметить, что уровень рН нормализуется после применения КС. Эти исследования предполагают, что увеличение кислотности в просвете дыхательных путей может объяснить увеличение уровня выдыхаемого NO и позволяет предположить, что серийное исследование уровня рН может помочь при титровании противовоспалительной терапии у больных БА. К сожалению, измерение рН может быть затруднено плохой воспроизводимостью этого метода [22,58].

Несмотря на отсутствие долгосрочных проспективных исследований, перспектива использования биомаркеров в КВВ при БА выглядит многообещающе. Эти данные предполагают, что воспаление дыхательных путей при БА персистирует несмотря на терапию КС. Они также подчеркивают важность лейкотриенового метаболического пути, продемонстрировав отсутствие его подавления при лечении КС. Стойкое увеличение уровня лейкотриенов в КВВ у пациентов, получающих КС-терапию, можно использовать как указание для использования ингибиторов лейкотриенов. Отсутствие корреляции между уровнем ОФВ₁ и концентрацией лейкотриенов в этих исследованиях выглядит достаточно разочаровывающе,

но это не отрицает потенциальной роли измерения лейкотриенов в КВВ при лечении БА.

Все эти методики могут представлять собой диагностическую ценность, предоставляя объективные данные для определения степени тяжести БА и оценки проводимой противовоспалительной терапии. Если изменение уровня биомаркеров предсказывает эти физиологические параметры, ценность этих исследований при БА будет возрастать.

Муковисцидоз

Заболевание легких при муковисцидозе характеризуется продолжительной постоянной бактериальной инфекцией дыхательных путей и подверженностью к повышенному оксидативному стрессу. На ранних стадиях заболевания у пациентов, несмотря на текущее воспаление, симптомов может не быть [60]. Постепенное начало поражения легких при муковисцидозе сделало очень важным тщательное наблюдение за состоянием этих пациентов и в результате привело к исследованиям КВВ.

При обследовании взрослых пациентов с клинически стабильным муковисцидозом не выявлено изменений уровня Н₂О₂ в КВВ, как и в группе здорового контроля [29]. Отсутствие увеличения уровня Н₂О₂ объяснили быстрой реакцией между Н₂О₂ и другими активными формами кислорода, нарушением диффузии из-за большого количества вязкого секрета в дыхательных путях и/или увеличением уровня антиоксидантов. Тем не менее при обследовании 16 детей с муковисцидозом, которые переносили обострение легочной инфекции, *Jobsis и соавт.* показали, что уровень Н₂О₂ в КВВ снизился, тогда как состояние пациентов клинически улучшилось после антибактериальной терапии [37]. Однако у части больных корреляция между уровнем Н₂О₂ и ОФВ₁ была слабая, и в этом исследовании не было контрольной группы.

При сопоставлении с Н₂О₂ уровень нитрита в КВВ увеличен у больных с клинически стабильным муковисцидозом по сравнению с контрольной группой [30]. Разницы в уровне выдыхаемого NO между двумя группами не выявлено. Эти данные согласуются с исследованием, которое показало увеличение уровня нитрита в мокроте пациентов с муковисцидозом [25]. Исследование детей с муковисцидозом подтвердило эти находки и показало увеличение уровня нитрита, которое было сравнимо с аналогичными данными у взрослых [18]. Интересно отметить, что интерлейкин-8 (ИЛ-8), провоспалительный цитокин, присутствовал только у трети детей с муковисцидозом. Напротив, *Balint и соавт.* в своем исследовании продемонстрировали, что концентрация ИЛ-8 у больных с обострением муковисцидоза значительно увеличена по сравнению со здоровыми [10]. После 2-недельного лечения его уровень достоверно снизился и позитивно коррелировал с числом нейтрофилов в крови. Теми же авторами показано, что у больных

со стабильным муковисцидозом повышен уровень нитротирозина, что связано с тяжестью течения заболевания [9]. У больных муковисцидозом, особенно в период обострения, в КВВ резко повышена концентрация натрия и хлора по сравнению со здоровыми субъектами, что может быть использовано для диагностики и мониторинга заболевания [11]. Нитрит, возможно, является более чувствительным маркером продукции NO в нижних отделах дыхательных путей благодаря его большей стабильности по сравнению с NO. Измерение уровня нитрита может быть полезно при определении субклинических форм обострения болезни у больных муковисцидозом и позволит начать адекватную терапию до появления первых симптомов.

Уровень 8-изопростана в КВВ был увеличен в 3 раза у пациентов с клинически стабильным муковисцидозом по сравнению с контрольной группой и негативно коррелировал со значением ОФВ₁ [52]. Была обнаружена положительная корреляция между концентрацией 8-изопростана и уровнем оксида углерода (CO) в выдыхаемом воздухе, что согласуется с другими исследованиями и представляет собой физиологическую защиту для предотвращения оксидативного стресса, вызванного CO [67].

В заключение результаты предварительных исследований предполагают потенциальную роль определения биомаркеров оксидативного стресса в КВВ при лечении больных муковисцидозом. Эти исследования могут дать клиницистам возможность диагностировать обострения раньше и начать лечение до появления симптомов. Анализ КВВ также может быть полезен для мониторинга эффективности лечения у данных пациентов.

Бронхоэктазы

Бронхоэктазы — это гнойное заболевание легких, характеризующееся значительным оксидативным стрессом, который может быть измерен при помощи H₂O₂ в выдыхаемом воздухе. В исследовании, проведенном Loukides и соавт. у пациентов с бронхоэктазами, в КВВ обнаружено достоверное повышение уровня H₂O₂ по сравнению с контрольной группой, а также была выявлена негативная корреляция между уровнем H₂O₂ и ОФВ₁ [44]. Пациенты с бронхоэктазами в противоположность БА, которые получали КС-терапию, имели уровень H₂O₂ в выдыхаемом воздухе схожий с уровнем у пациентов, которые не получали КС. Это частично было объяснено относительно малой эффективностью КС при снижении нейтрофильной активности в первичном источнике H₂O₂ в дыхательных путях у пациентов с бронхоэктазами. Эти находки согласуются с наличием продолжающегося воспаления в дыхательных путях при бронхоэктазах, а также с субклиническим течением болезни. Уровень pH у больных с бронхоэктазами был достоверно ниже, чем у больных легкой и тяже-

лой БА и здоровых испытуемых [42]. Также у некурящих больных с бронхоэктазами выявлено значительное повышение содержания эйкозаноидов (ЛТ В₄, 8-изопростан) [34,48]. Обратная корреляция с физиологическими параметрами может применяться для мониторинга активности воспаления на ранних стадиях болезни.

Острый респираторный дистресс-синдром

Baldwin и соавт. продемонстрировали увеличение уровня H₂O₂ в КВВ у пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом взрослых (ОРДС) по сравнению с пациентами с другими заболеваниями легких, включая пневмонию [8]. В следующем исследовании не было обнаружено никакой разницы между пациентами с ОРДС и с легочными инфильтратами, но без ОРДС [65]. Однако обе группы имели более высокий уровень H₂O₂ по сравнению с контрольной группой. Пациенты с сепсисом и тяжелым поражением мозга имели наиболее высокий уровень H₂O₂ в КВВ. Wilson и соавт. подтвердили эти исследования, продемонстрировав высокий уровень H₂O₂ в КВВ у пациентов с ОРДС по сравнению с контролем [66]. Точно также пациенты с ОРДС имели более высокий уровень H₂O₂ по сравнению с пациентами с другими заболеваниями легких [41].

Carpenter и соавт. измеряли уровень 8-изопростана в КВВ у пациентов с острым повреждением легких или находившихся в группе риска по развитию ОРДС, а также у здоровых интубированных [15]. У большинства пациентов из группы риска по ОРДС уровень 8-изопростана был больше двух стандартных отклонений от среднего значения по сравнению с контрольной группой. Не выявлено корреляции между уровнем 8-изопростана и фракцией вдыхаемого кислорода у пациентов в группе риска по острому повреждению легких и ОРДС. Отсутствие разницы в уровне простагландина E₂ (ПГЕ₂) в КВВ между пациентами, находящимися в группе риска по острому повреждению легких или ОРДС, и здоровыми позволяет предположить, что большая часть 8-изопростана была образована при помощи перекисного окисления липидов.

Эти исследования подтверждают предположение о вовлечении активных форм кислорода в патофизиологический процесс при остром повреждении легких и/или ОРДС. К сожалению, отсутствие специфичности острого повреждения легких или ОРДС ограничивает применение этих биомаркеров в клинической практике. Недавние исследования у пациентов с ОРДС показали, что режимы вентиляции с использованием большого объема и низкого положительного давления в конце выдоха связаны с увеличением альвеолярного уровня цитокинов, например интерлейкина-6 [61]. Повторные измерения цитокинов в КВВ могут использоваться как биомаркеры для мо-

нитирования повреждений легких, связанных с вентилицией, при лечении ОРДС.

Хроническая обструктивная болезнь легких

Отсутствие баланса между оксидативным стрессом и антиоксидантной способностью легких является важной частью развития и прогрессирования хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Многочисленные исследования продемонстрировали увеличение уровня H_2O_2 в КВВ у пациентов со стабильной ХОБЛ по сравнению со здоровыми людьми, при этом дальнейшее увеличение было отмечено при обострении заболевания [20,39,55]. Также было показано, что концентрация H_2O_2 в КВВ резко повышается у больных с ХОБЛ после перенесенной вирусной инфекции [19]. *Kasielski и Nowak* в двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании с двумя параллельными группами установили, что длительный прием ацетилцистеина снижает уровень H_2O_2 в КВВ у больных со стабильной ХОБЛ [39]. Уровень H_2O_2 также коррелировал с числом эозинофилов в индуцированной мокроте. К сожалению, в этом исследовании не найдено корреляции между уровнем H_2O_2 и $ОФВ_1$ у клинически стабильных пациентов и больных с обострением ХОБЛ. В другом исследовании *Montuschi и соавт.* продемонстрировали уровень 8-изопростана в КВВ как биомаркера оксидативного стресса у пациентов с ХОБЛ и исследовали влияние курения на содержание этой субстанции [50]. Они обнаружили, что уровень 8-изопростана одинаков у бывших курильщиков и у продолжающих курить пациентов с ХОБЛ, и был увеличен в 1,8 раза по сравнению со здоровыми курильщиками. У здоровых курильщиков в 2,2 раза повышен уровень 8-изопростанов по сравнению со здоровыми некурящими. Воздействие курения на оксидативный стресс в нижних дыхательных путях был определен при помощи 50% увеличения уровня 8-изопростана в выдыхаемом воздухе через 15 мин после курения. *Antczak и соавт.* выявили, что у больных с обострением ХОБЛ в КВВ повышена концентрация ПГЕ₂, ЛТ В₄ и цистеиновых лейкотриенов, через 7-10 дней после лечения концентрация лейкотриенов достоверно снизилась [4]. И наконец, пациенты с ХОБЛ имели повышенный уровень нитрита и нитрозотиола в КВВ по сравнению с нормальными субъектами и здоровыми курильщиками [16,42].

Эти исследования подтверждают концепцию, что воспаление дыхательных путей имеет место при ХОБЛ, даже если пациенты находятся в клинически стабильном состоянии. Значительное усиление оксидантной нагрузки отмечается во время обострения заболевания и сразу же после курения. Это предполагает, что определение биомаркеров оксидативного стресса можно использовать в качестве дополнительного метода при мониторинге состояния этих пациентов.

Другие заболевания легких

В небольшом исследовании, включающем 13 пациентов с различными формами респираторной патологии, анализ КВВ от 3 пациентов с интерстициальными заболеваниями легких выявил ИЛ-1, растворимый ИЛ-2-рецептор и туморнекротический фактор α [49,63]. *Isola и соавт.* показали, что уровень 8-изопростана достоверно увеличен у больных с идиопатическим фиброзирующим альвеолитом по сравнению со здоровыми людьми, и коррелирует с тяжестью заболевания [35]. Также было обнаружено, что уровень H_2O_2 в КВВ у больных раком легкого достоверно повышен по сравнению с пациентами со стабильной ХОБЛ и здоровыми людьми. Концентрация H_2O_2 негативно коррелировала с $ОФВ_1$ [68]. При саркоидозе достоверно повышен уровень 8-изопростана по сравнению со здоровыми, что указывает на увеличение перекисного окисления липидов [59]. Биомаркеры оксидативного стресса были также выявлены в КВВ у пациентов с пневмонией, раком легкого и после торакотомии [43,63].

Преимущества и ограничения

В настоящее время анализ КВВ является неинвазивным методом исследования легочной патологии и имеет ряд преимуществ (табл.2). Его легко проводить и он обладает высокой воспроизводимостью [33]. Аппарат портативен и может использоваться в поликлинической практике и даже на дому. КВВ отражает патологию, отмеченную при традиционных методах исследования респираторного тракта, включающего БАЛ и индуцированную мокроту [6,38]. Он не повреждает слизистую респираторного тракта и не имеет факторов растворения, что наблюдается при получении образцов во время бронхоскопии и БАЛ. Пациентов можно исследовать в любом возрасте. Конденсат можно получать как у пациентов со спонтанным дыханием, так и у больных, находящихся на ИВЛ [8,65]. Получение образцов КВВ может представлять собой повторяющееся и последовательное исследование состояния нижних дыхательных путей, не прибегая к инвазивным методам, таким как бронхоскопия с БАЛ и индуцированная мокрота [40].

Использование КВВ является многообещающим исследованием потому, что оно обладает простой неинвазивной техникой взятия образца альвеолярной жидкости для определения содержания различных биомаркеров. Однако у него есть свои ограничения (см. табл.2), среди которых отсутствие стандартных методик сбора КВВ является наиболее важным. КВВ может обладать концентрационными артефактами из-за испарения воды из капелек жидкости до того, как произойдет настоящая конденсация. Для проверки точности собранных образцов оборудование следует тестировать с использованием аэрозолей рас-

Преимущества и ограничения сбора и анализа конденсата выдыхаемого воздуха

Преимущества	Ограничения
простое вмешательство у постели больного	отсутствие стандартной методики взятия образцов
большее число пациентов включено, чем исключено (например, здоровые дети и младенцы на ИВЛ)	неспецифичность по анатомическим участкам
возможность использовать на дому	отсутствие доказательства происхождения аэрозольных частиц (бронхи или альвеолы)
длительное и последовательное взятие образцов	артефакты по изменению концентрации (из-за испарения образцов)
нелетучие соединения, связанные с патофизиологией легких	не изучена полезность и возможность биомаркеров, не связанных с оксидативным стрессом
фармакокинетика и фармакодинамика лекарственных препаратов	мало информации по биомаркерам при интерстициальных болезнях легких
клиренс жидкостей	

творов с известными концентрациями медиаторов до сбора образца. Другое ограничение заключается в том, что собранная жидкость анатомически неспецифична, т.е. она состоит из частиц, полученных из жидкости покрывающей нижние дыхательные пути и альвеолы. Их соотношение неизвестно, и место, из которого получены частицы, следует определить в будущем.

Сбор КВВ является перспективным методом исследования. Стандартизацию процедуры сбора образцов следует предпринять для того, чтобы сравнить данные различных групп исследования. Необходимо дальнейшее исследование суточных колебаний уровней медиаторов у пациентов и здоровых волонтеров. Определение корреляции уровня веществ в КВВ по сравнению с другими установленными методиками по определению легочного воспаления, например БАЛ, необходимо для оценки этого метода. Число медиаторов, определяемых в КВВ, стремительно растет. В добавление к медиаторам, другие протеины, липиды, ДНК и РНК из клеток млекопитающих и микроорганизмов, также как и лекарства, могут обнаруживаться в КВВ, делая его потенциальным источником исследования в микробиологии и генетике. Например, так как микобактерия присутствует в ядре, можно предположить, что большие протеины и/или РНК микобактерий могут быть определены в КВВ на ранних стадиях инфекции. Очевидно, это исследование предполагает большое поле для дальнейших исследований. Сбор и анализ КВВ может явиться ценным неинвазивным методом для оценки лечения и дальнейшего наблюдения пациентов с различными легочными заболеваниями.

Заключение

Сбор и анализ КВВ представляет собой быстро развивающееся направление для исследований. Процедура сбора проста и неинвазивна, собранная жид-

кость представляет собой аэрозольную фракцию жидкости, покрывающей нижние дыхательные пути. Исключение примеси слюны является важной частью правильного сбора образца. В настоящее время множество различных соединений, большинство которых являются биомаркерами оксидативного стресса в нижних дыхательных путях, были определены в КВВ у здоровых волонтеров и пациентов с астмой, ХОБЛ, муковисцидозом, бронхоэктазами, ОРДС и другими легочными заболеваниями. Определение этих биомаркеров может быть использовано как неинвазивный метод диагностики различных заболеваний легких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adler K., Woolen O., Philippoff W. et al. Physical properties of sputum: 3. Reologic variability and intrinsic relationships. Am. Rev. Respir. Dis. 1972; 106: 86-96.
2. Agostoni P., Arena V., Doria E., Susini G. Inspired gas relative humidity affects systemic to pulmonary bronchial blood flow in humans. Chest 1990; 97: 1377-1380.
3. Antczak A. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. Eur. Respir. J. 1997; 10 (6): 1235-1241.
4. Antczak A., Gorski P. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes, leukotriene B₄ and 8-isoprostane in exacerbation of COPD. Ibid. 2001; 18 (suppl. 33): A1696.
5. Antczak A., Kurmanowska Z., Kasielski M., Nowak D. Inhaled glucocorticosteroids decrease hydrogen peroxide level in expired air condensate in asthmatic patients. Respir. Med. 2000; 94 (5): 416-421.
6. Arias-Diaz J., Vara E., Torres-Melero J. et al. Nitrite/nitrate and cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. Cancer (Philad.) 1994; 74: 1546-1551.
7. Baile EM., Dahlby R.W., Wiggs B.R., Pare P.D. Role of tracheal and bronchial circulation in respiratory heat exchange. J. Appl. Physiol. 1985; 58: 217-222.
8. Baldwin S.R., Simon R.H., Grum CM. et al. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. Lancet 1986; 1: 11-14.
9. Balint B., Kharitonov S.A., Hanazawa T. et al. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. Eur. Respir. J. 2001; 17: 1201-1207.

10. Balint B., Kharitonov S.A., Kazuhiro I. et al. Increased IL-8 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis during acute exacerbation. *Ibid.* 2001; 18 (suppl. 33): A3596.
11. Balint B., Kharitonov S.A., Kemp M. et al. Ionic composition of exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Ibid.*
12. Becher G., Winsel K., Beck E., Steremann E. Leukotriene B₄ in breathing condensate of patients with bronchopulmonary diseases and of normal patients. *Appl. Cardiopulmon. Pathophysiol.* 1995; 5: 215-219.
13. Blankenburg T., Schaedlich S., Schuette W. Exhaled breath condensate as a sensitive diagnostic aid in asthma bronchiale. *Eur. Respir. J.* 2000; 16 (suppl. 31): A1907.
14. Buccioni E., Kharitonov S.A., Csoma Z., Barnes P.J. Exhaled breath histamine is reduced following methacholine challenge in patients with mild asthma. *Ibid.* 2001; 18 (suppl. 33): A1111.
15. Carpenter C.T., Price P.V., Christman B.W. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998; 114 (6): 1653-1659.
16. Corradi M., Montuschi P., Donnelly L.E. et al. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163 (4): 854-858.
17. Csoma Z., Kharitonov S.A., Shahid S.K. et al. Leukotrienes in exhaled breath condensate of children with asthma. *Eur. Respir. J.* 2001; 18 (suppl. 33): A358.
18. Cunningham S., McColm J.R., Ho L.P. et al. Measurement of inflammatory markers in the breath condensate of children with cystic fibrosis. *Ibid.* 2000; 15: 955-957.
19. De Benedetto F., Aceto A., Dragani B. et al. Validation of a new technique to assess exhaled hydrogen peroxide: results from normals and COPD patients. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 2000; 55 (3): 185-188.
20. Dekhuijzen P.N., Aben K.K., Dekker I. et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154: 813-816.
21. Dohlman A.W., Black H.R., Royall J.A. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 148: 955-960.
22. Effros R.M. Endogenous airway acidification: implications for asthma pathology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163 (1): 293-294.
23. Fairchild C.I., Stampfer J.E. Particle concentration in exhaled breath. *Am. Industr. Hyg. Assoc. J.* 1987; 48: 948-949.
24. Ganas K., Loukides S., Papatheodorou G. et al. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir. Med.* 2001; 95 (8): 649-654.
25. Gaston B., Drazen J.M., Loscalzo J., Stamler J.S. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 149: 538-551.
26. Guatura S.B., Martinez J.A., Santos M.L. Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption. *Sao Paulo Med. J.* 2000; 118 (4): 93-98.
27. Hanazawa T., Kharitonov S.A., Barnes P.J. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162: 1273-1276.
28. Hanazawa T., Kharitonov S.A., Oldfield W.L.G. et al. Levels of nitrotyrosine and cysteinyl leukotrienes in breath condensates are elevated after withdrawal of steroid treatment in asthmatic patients. *Eur. Respir. J.* 2000; 16 (suppl. 31): A3701.
29. Ho L.P., Faccenda J., Innes J.A., Greening A.P. Expired hydrogen peroxide in breath condensate of cystic fibrosis patients. *Ibid.* 1999; 13: 103-106.
30. Ho L.P., Innes J.A., Greening A.P. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53 (8): 680-684.
31. Horvath I., Donnelly L.E., Kiss A. et al. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158: 1042-1046.
32. Hunt J., Byrns R.E., Ignarro L.J., Gaston B. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma. *Lancet* 1995; 346: 1235-1236.
33. Hunt J.F., Fang K., Malik R. et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 694-699.
34. Isola N., Csoma Z., Kharitonov S.A. et al. Exhaled 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in patients with bronchiectasis. *Eur. Respir. J.* 2001; 18 (suppl. 33): A1697.
35. Isola N., Kharitonov S.A., Wells A.U. et al. Exhaled 8-isoprostane as a non-invasive marker of oxidative stress in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis. *Ibid.* 2001; 18 (suppl. 33): A2772.
36. Jobsis Q., Raatgeep H.C., Hermans P.W., de Jongste J.C. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Ibid.* 1997; 10 (3): 519-521.
37. Jobsis Q., Raatgeep H.C., Schellekens S.L. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment. *Ibid.* 2000; 16: 95-100.
38. Kanazawa H., Shoji S., Yamada M. et al. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 99: 624-629.
39. Kasielski M., Nowak D. Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 2001; 95 (6): 448-456.
40. Kharitonov S.A., Barnes P.J. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163: 1693-1722.
41. Kietzmann D., Kahl R., Muller M. et al. Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med.* 1993; 19: 78-81.
42. Kostikas K., Papatheodorou G., Ganas K. et al. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Eur. Respir. J.* 2001; 18 (suppl. 33): A1693.
43. Lases E.C., Duurkens V.A., Gerritsen W.B., Haas F.J. Oxidative stress after lung resection therapy: A pilot study. *Chest* 2000; 117 (4): 999-1003.
44. Loukides S., Horvath I., Wodehouse T. et al. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158 (3): 991-994.
45. Manolis A. The diagnostic potential of breath analysis. *Clin. Chem.* 1983; 29: 5-15.
46. McFadden E.R.Jr. Respiratory heat and water exchange: physiological and clinical implications. *J. Appl. Physiol.* 1983; 54: 331-336.
47. Metheny N.A., Stewart B.J., Smith L. et al. pH and concentration of bilirubin in feeding tube aspirates as predictors of tube placement. *Nurs. Res.* 1999; 48: 189-197.
48. Montuschi P., Barnes P.J. Eicosanoids in breath condensate: new non-invasive biomarkers of airway inflammation. *Eur. Respir. J.* 2000; 16 (suppl. 31): A3698.
49. Montuschi P., Ciabattini G., Paredi P. et al. 8-isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158: 1524-1527.
50. Montuschi P., Collins J.V., Ciabattini G. et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Ibid.* 2000; 162 (3, pt 1): 1175-1177.
51. Montuschi P., Corradi M., Ciabattini G. et al. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Ibid.* 1999; 160 (1): 216-220.
52. Montuschi P., Kharitonov S.A., Ciabattini G. et al. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55 (3): 205-209.
53. Moore K., Roberts L.J. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 1998; 28: 659-671.
54. Mutlu G.M., Garey K.W., Robbins R.A. et al. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164 (5): 731-737.