

ПОЛУЧЕНИЕ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА И АНАЛИЗ МАРКЕРОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ

Определение нелетучих медиаторов и маркеров из воздухопроводящей системы легких включает такие непростые для больного процедуры как бронхоальвеолярный лаваж или индуцированная мокрота. Поскольку они сопряжены с вмешательством в организм испытуемого, их нельзя проделать повторно за короткий промежуток времени. Получение конденсата путем охлаждения или замораживания выдыхаемого воздуха – полностью безопасная процедура, которая не оказывает никакого влияния на дыхательные пути. Накапливаемые сведения указывают на то, что обнаруживаемые изменения состава конденсата и выдыхаемых маркеров отражают нарушения, которые происходят в жидкостном слое, выстилающем поверхность бронхиального дерева.

Ключевые слова: легкие, воспаление, цитокины, эйкозаноиды, нитриты, перекись водорода.

The detection of non-volatile mediators and markers from the respiratory tract involves an invasive or provocation technique, such as bronchoalveolar lavage or induced sputum. The can not be repeated within a short period of time because of their invasiveness, or pro-inflammatory effect. Exhaled breath condensate, collected by cooling or freezing of exhaled air, is totally noninvasive, collection procedure has no influence on airways, and there is accumulative evidence that abnormalities in condensate chemistry and exhaled markers reflect intrinsic abnormalities of the airway lining fluid. Key words: lung, inflammation, cytokines, eicosanoids, nitrites, hydrogen peroxide.

Традиционные методы получения образцов для исследования секрета из нижних отделов дыхательных путей включают сбор обычной и индуцированной мокроты, бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) при проведении бронхоскопии. Последний метод до настоящего времени остается преимущественно используемым. Вместе с тем, обременительная для обследуемого человека процедура бронхоскопии заставляет постоянно изыскивать другие, более простые методы, которые можно было бы использовать в амбулаторных условиях, в особенности у детей. Сравнительно недавно нарастающий интерес вызвал конденсат выдыхаемого воздуха, как простое, не требующее вмешательства в организм средство получения информации о нижних отделах дыхательных путей у человека.

Жидкость, выстилающая тонким слоем нижние отделы дыхательных путей, содержит в своем составе, как нелетучие, так и более 200 испаряющихся веществ (2,4). Они составляют первую линию защиты от оксидантов окружающей среды, поступающих с вдыхаемым воздухом (табачный дым, озон, окислы азота), аллергенов, микробной и бактериальной инфекции. Качественные и количественные характеристики этих соединений отражают повреждение дыхательных путей, воспалительные изменения, эффект лечения. Поэтому они могут использоваться для слежения за динамикой легочных заболеваний.

Белорусские ученые-кардиологи, вероятно, первыми в 80-х годах прошлого столетия приступили к масштабному исследованию конденсата (4). Ими было разработано специальное устройство, с помощью которого можно было собирать конденсат при обычном дыхании человека, снизив до минимума загрязнение его

слюной. В тот период предполагалось, что в конденсате содержится ощутимое количество липидов, которые входят в состав сурфактанта легких. В дальнейшем было показано, что при использовании даже заведомо большого объема конденсата (8–10 мл) удастся обнаружить только следы липидного фосфора – основного компонента сурфактанта легких (5). Зато выяснилось, что в этой жидкости содержится целый ряд других соединений, определение которых может стать информативным для клиники.

В последние годы усилия ученых были сконцентрированы на определении в КВВ цитокинов и эйкозаноидов, окиси азота и продуктов ее метаболизма, электролитов и активных форм кислорода. Конечно, такие исследования проводились, в первую очередь, при различных заболеваниях легких: бронхиальной астме и муковисцидозе, хронических обструктивных заболеваниях легких (ХОЗЛ) и интерстициальной легочной патологии. В этом обзоре сделана попытка суммирования имеющихся сведений с тем, чтобы критически оценить перспективу изучения КВВ для клиники.

Природа КВВ

Происхождение молекул, определяемых в КВВ, различно. Они могут быть первоначально локализованы в ротовой полости и глотке, в трахеобронхиальной системе и в альвеолах. Пропорциональный вклад их в измеряемый в конденсате уровень того или иного соединения недостаточно исследован. Считается, что основные нелетучие компоненты этой жидкости являются метаболическими продуктами клеток, выстилающих воздухопроводящие пути.

Сбор КВВ и факторы, влияющие на его анализ

В литературе описаны различные методы сбора конденсата. Пожалуй, самым распространенным является тот, когда испытуемый дышит через специальный ротовой мундштук, снабженный клапаном. Клапан не позволяет смешиваться вдыхаемому и выдыхаемому воздуху. Во время выдыхания воздух поступает в конденсор, который охлаждается таящим льдом (31) или рефрижераторным устройством (Eco Screen, Jaeger, ФРГ). Сохранение низкой температуры в период сбора конденсата важно, поскольку это препятствует разрушению некоторых маркеров, например, 8-изопростана или лейкотриенов. Для получения 1–3 мл конденсата обычно требуется 10 – 15 мин.

Загрязнение слюной может оказывать влияние на уровень различных маркеров в КВВ. Так, присутствие большого количества эйкозаноидов в слюне у детей при обострении астмы (3) или нитритов/нитратов после принятия пищи с большим количеством этих соединений (42) может оказывать влияние на уровень эйкозаноидов или маркеров метаболизма окиси азота в конденсате. Поэтому при сборе конденсата необходим постоянный контроль загрязнения его слюной. Это осуществляют, например, по определению активности α -амилазы.

Количество КВВ зависит от количества воздуха, выдыхаемого в единицу времени (минутный объем) (31, 37), температуры выдыхаемого воздуха и влажности.

Перекись водорода

В составе КВВ взрослых людей обнаружена более высокая концентрация H_2O_2 , чем у детей (7,12,21,23). С другой стороны, у здоровых детей не было корреляции между уровнем выдыхаемого H_2O_2 и возрастом, половой принадлежностью и состоянием функциональной способности легких (23). Зато имелась взаимосвязь между выдыхаемой H_2O_2 и количеством эозинофилов в мокроте, гиперреактивностью воздухопроводящих путей при астме различной степени тяжести. Концентрация H_2O_2

сохранялась повышенной у астматиков с тяжелым нестабильным течением этого заболевания, в то время как уровень выдыхаемого NO у таких больных после лечения кортикостероидами снижался (21). В качестве причины обнаруженной закономерности предполагается, что нейтрофилы, которые преобладают в бронхах, особенно при тяжелой астме, продуцируют увеличенное количество супероксидных радикалов (6).

Сигаретный дым вызывает поступление нейтрофилов и других клеток, участвующих в формировании воспалительного процесса, в нижние отделы дыхательных путей. Эти клетки продуцируют H₂O₂, уровень которой в КВВ курящих людей был в 5 раз выше, чем у некурящих (35). Еще больше он повышался при ХОЗЛ (11,36). Интересно, что хотя курение рассматривают как наиболее частую причину развития ХОЗЛ, эти заболевания встречались только у 10% - 20% курящих людей. При этом не было обнаружено существенных различий уровня H₂O₂ при ХОЗЛ между курящими и теми, кто никогда не курил. Точно также не удалось обнаружить никакой корреляции между концентрацией H₂O₂ в КВВ и количеством ежедневно выкуриваемых сигарет (36). Таким образом, признавая тот факт, что окислительный стресс характерен для ХОЗЛ, вряд ли его происхождение всегда обусловлено курением.

Увеличенный уровень перекиси водорода в КВВ обнаружили также при дистресс-синдроме взрослых (8,19) и бронхоэктатической болезни (30).

Эйкозаноиды

Изопростаны являются продуктами свободнорадикального окисления архидоновой кислоты. Они служат не просто маркерами липоперекисных процессов, но и сами обладают биологической активностью. В частности, они могут выполнять роль посредников в воздействии на клетки продуктов окислительного стресса. Они также осуществляют взаимосвязь между обменом активных форм кислорода и азота.

Значение изопростанов как потенциальных маркеров при астме, видимо, проявилось тогда, когда в БАЛЖ у таких больных, при проведении проб на выявление аллергена, было обнаружено повышение концентрации F₂-изопростанов (13). В дальнейшем было показано, что уровень 8-изопростана в КВВ больных астмой (легкое течение) в 2 раза превышал норму. При тяжелом течении, независимо от проводимого лечения кортикостероидами, его концентрация превышала норму в 3 раза (31). Отсутствие эффекта от применения кортикостероидов на уровень выдыхаемого 8-изопростана авторы объясняют тем обстоятельством, что кортикостероиды вообще малоэффективны в ингибировании окислительного стресса. С другой стороны, это же свойство дает изопростанам преимущество служить в качестве маркеров выбора при оценке тяжести окислительного стресса у больных астмой.

Есть сведения, что уровень 8-изопростана в КВВ у курильщиков (32) увеличен в значительно большей степени, у больных ХОЗЛ (33).

Если исходить из того, что для интерстициальных заболеваний легких, таких как криптогенный фиброзирующий альвеолит, фиброзирующий альвеолит с системным склерозом, характерно развитие окислительного стресса, а важным патогенетическим звеном саркоидоза является дисбаланс в оксидантно-антиоксидантной системе, следует ожидать изменения уровня изопростанов в составе КВВ таких больных. Такова перспектива будущих разработок. Она подкрепляется тем обстоятельством,

что в БАЛЖ при этих заболеваниях обнаруживается увеличенный уровень 8-эпи-простагландина F2.

Для муковисцидоза также характерны наличие окислительного стресса в клетках, локализованных в воздухопроводящих путях, разобщение антиоксидантной защитной системы (низкий уровень глутатиона и повышенный 8-изопростанов в плазме крови, увеличение концентраций лейкотриена В4 в БАЛЖ) (10). Недавно было показано, что у больных со стабильным течением этого заболевания концентрация 8-изопростана, как и интерлейкина (Ил)-8, в КВВ превышала в 3 раза нормальный уровень (24). При обострении уровень Ил-8 еще больше возрастал, и уменьшался после лечения антибиотиками.

Простагландины (Пг)

Известно, что при астме, ХОЗЛ и муковисцидозе в клетках усилена экспрессия циклоксигеназы-2, ответственной за образование Пг и тромбоксанов (27,41). Некоторые из этих Пг обладают противовоспалительным действием, а другие, к примеру, ПгE2, предотвращают образование активных форм азота в клетках. Будучи введенными ингаляционным путем, они способны снижать уровень выдыхаемого NO у больных астмой (26).

Измерение концентрации Пг E2 и Пг F2a в КВВ показало, что она существенно выше, по сравнению со здоровыми людьми, у больных ХОЗЛ, но не у больных астмой (34). Наоборот, уровень тромбоксана В2 был увеличен при астме, но не при ХОЗЛ.

Лейкотриены (Лт)

К ним относится семейство медиаторов липидной природы, образующихся из арахидоновой кислоты с помощью фермента - 5-липоксигеназы. Все они обладают провоспалительным действием и принимают участие в формировании астмы. Лейкотриены, связанные с остатком аминокислоты – цистеина (ЛтC4, ЛтD4, ЛтE4) образуются в разных клетках (тучных клетках, макрофагах, эозинофилах). Они обладают способностью вызывать сокращение гладких мышц бронхиальной стенки, стимулировать секрецию слизи и уменьшать мукоциллиарный клиренс (28). Вместе с тем, им присущи сосудорасширяющее действие и способность увеличивать проницаемость сосудистой стенки, облегчая проникновение эозинофилов в воздухоносные пути. Они стимулируют выделение окиси азота из нейтрофилов человека и проявляют хемотактическую активность к нейтрофилам.

В КВВ здоровых людей и больных астмой удалось определить концентрацию ЛтB4, C4, D4, E4 и F4 (9). Даже при легком течении астмы уровень некоторых из них был увеличен (18). Отмена кортикостероидов при умеренной астме ухудшала течение заболевания и сопровождалась значительным увеличением концентрации лейкотриенов в КВВ (18).

Белки и цитокины

Имеющаяся информация относительно концентрации белков и их идентификации в КВВ весьма противоречива. Результаты обследования 8 здоровых людей привели к заключению о том, что белок КВВ происходит, главным образом, из носоглотки и только частично - из нижних отделов дыхательных путей (39). Среди белков, обнаруженных у разных групп больных, указывается на присутствие Ил-1b, Ил-6, фактора некроза опухолей-а, рецепторного белка для Ил-2. Недавно появилось сообщение об обнаруженном более высоком содержании белка в КВВ молодых курильщиков (15). При муковисцидозе уровень белка в конденсате зависел от течения

заболевания. Если при стабильном течении он имел только тенденцию к повышению, то у больных с нестабильным течением он был в 2 раза выше нормы (24).

Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ)

Среди различных методов, которые используются для измерения ПОЛ в биологическом материале, наиболее простым, но наименее специфичным является метод определения продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Если концентрация этих продуктов нарастает, как это, к примеру, было обнаружено в КВВ при астме и ХОЗЛ (7), данные следует подтвердить другими, более точными методами.

Нитраты, нитриты, S-нитрозотиолы и нитротирозин

NO реагирует с супероксиданионом с образованием пероксинитрита или - с серусодержащими биомолекулами, такими как цистеин и глутатион, с образованием S-нитрозотиолов (40). Промежуточные продукты обмена NO, в частности пероксинитрит, могут вызывать ковалентную модификацию структуры различных биомолекул. В составе КВВ определяются нитрозо- и нитропроизводные типа 3-нитротирозина. Это позволяет получить информацию о состоянии метаболизма NO и его роли в воспалительном процессе воздухопроводящих путей и окислительном стрессе.

В КВВ, самостоятельно собранном больными астмой в домашних условиях, был обнаружен высокий уровень нитритов (22). Из этих данных пришли к заключению о целесообразности использования данного теста в качестве «домашнего» маркера обострения астмы. В трахеальной жидкости детей с дыхательной недостаточностью, страдающих астмой, отмечен чрезмерно низкий уровень S-нитрозотиолов (16). Исследования показали, что в КВВ их концентрация оставалась сниженной и через 3 недели после начала ингаляционного введения в организм стероидов (25). Учитывая то обстоятельство, что S-нитрозотиолы обладают бронхорасширяющим действием, увеличение их уровня могло бы послужить целью для создания нового подхода к терапии астмы.

В отличие от S-нитрозотиолов первоначально увеличенный уровень нитритов/нитратов в КВВ этих же больных быстро снижался, а степень снижения зависела от дозы стероидов, что указывает на большую чувствительность этого показателя к противовоспалительному лечению. А вот увеличенный уровень нитротирозина в КВВ сопутствовал ухудшению легочной функции у больных астмой (18). Это даже дало основание считать его прогностическим признаком ухудшения течения астмы. Чрезмерную продукцию нитротирозина в данном случае связывают с накоплением агрессивных промежуточных продуктов метаболизма NO, образующихся при взаимодействии окиси азота с активными формами кислорода.

У больных муковисцидозом, как в период стабилизации патологического процесса, так и в период обострения, в КВВ обнаружен подъем уровня нитритов и нитратов [55]. Интересно, что концентрация NO при этом не была повышена (17,29). Наиболее вероятным объяснением такой особенности является сниженная диффузия NO через большие объемы секретов, обладающих повышенной вязкостью у больных муковисцидозом.

Другие исследователи показали, что как концентрация нитритов, так и выдыхаемого NO, зависела от степени закисления содержимого дыхательных путей (23). Самой низкой рН была у больных астмой до лечения. Курс лечения, включавший ингаляционное введение им кортикостероидов, восстанавливал нормальное значение

pH. Оказалось, что низкое значение pH способствовало превращению нитритов в NO. Поэтому уровень нитритов у больных с низким значением pH в дыхательных путях не отличался от нормального. Наоборот, при нормальных значениях pH концентрация нитритов существенно повышалась. Эти данные позволили объяснить те, на первый взгляд, контрастные результаты, которые были получены у взрослых и у детей, страдающих астмой (6,14,21). Кортикостероидная терапия больных с тяжелой астмой приводит к изменению pH в воздухопроводящих путях. Поэтому в конденсате выдыхаемого воздуха у таких больных растет уровень нитритов, а концентрация выдыхаемого NO снижается. Она остается все еще выше, чем у здоровых людей, но меньше, чем у больных с нетяжелой астмой до начала курса лечения.

Таким образом, измерение концентрации нитритов в КВВ у больных астмой и муковисцидозом дает не меньшую информацию, чем измерение концентрации выдыхаемого NO. Вместе с тем, сама процедура измерения NO требует тока воздуха с постоянной скоростью. Если у взрослых людей это достижимо, то в педиатрической практике представляет непреодолимое препятствие, особенно у маленьких детей. В таких случаях сбор и исследование КВВ может стать процедурой выбора.

Электролиты

Одним из механизмов развития бронхоспазма при астме является увеличение осмолярности жидкости в нижних отделах дыхательных путей после физической нагрузки. Гиперосмолярность выполняет роль триггера тучных клеток, затем развивается бронхоспазм. С другой стороны, в КВВ больных при атопической астме обнаружили дефицит магния и увеличенный уровень кальция (1). Полагают, что внутривенное введение магния совместно с бронходилататорами и кортикостероидами при тяжелом течении астмы будет способствовать расширению бронхов (38). Отсюда вытекает важность определения электролитов в КВВ для назначения адекватной терапии и контроля ее эффективности у таких больных.

Заключение

Приведенные сведения показывают, что исследование КВВ позволяет, не вторгаясь в организм, в любое время получить информацию о патобиологии легких. Преимуществами этого метода являются:

- Простота и воспроизводимость.
- Компактность и возможность осуществления в поликлинических и даже домашних условиях.
- Сопоставимость изменений с теми, которые обнаруживаются при использовании традиционных методов (БАЛЖ, индуцированная мокрота).
- Безопасность для слизистой бронхов, отсутствие фактора разведения, имеющих место при проведении бронхоскопии и БАЛ.
- доступность для пациентов любого возраста.
- возможность получения результата при спонтанном дыхании и при механической вентиляции легких.

К имеющимся на сегодняшний день недостаткам этого метода относится, прежде всего, отсутствие стандартной методики сбора КВВ. Нет гарантии, что во время конденсации выдыхаемых паров с образующихся капелек жидкости происходит испарение воды. Для правильного получения КВВ аппарат для его сбора следует испытывать с помощью аэрозольных растворов, содержащих известные концентрации определяемых веществ. Еще одним недостатком является отсутствие специфичности КВВ для какого-то определенного анатомического образования. Полагают, что

конденсат содержит частицы жидкости, выстилающей нижние отделы дыхательных путей и альвеолы. Но не определен относительный вклад этих структур. Требуется уточнения и вопрос, из какого именно отдела нижних дыхательных путей происходят аэрозольные частицы.

Перечисленные недостатки в исследовании КВВ устранимы. Они просто указывают на направление будущих разработок этого метода. Можно сформулировать и некоторые другие перспективы исследования КВВ. К ним относится характеристика суточных колебаний его компонентов в норме и патологии. Для определения маркеров, патогномоничных конкретному заболеванию, следует установить коррелятивные связи между ними и результатами клинического обследования больного. Такую же корреляцию необходимо четко определить между показателями в КВВ и в БАЛЖ.

Хочется надеяться, что КВВ в скором времени будет служить удобным инструментом в рутинной клинической практике для получения достоверной информации о процессах, протекающих в респираторной системе при различных заболеваниях легких.

Литература

1. Емельянов А.В., Петрова М.А., Лаврова О.В. и др. Нарушение минерального обмена на различных стадиях развития бронхиальной астмы //Тер. Арх. 1995; 67:45-47.
2. Курик М.В., Ролик М.В., Пархоменко Н.В. и др. Физические свойства конденсата выдыхаемого воздуха у больных хроническим бронхитом //Врач. Дело 1987; № 1: 37-39
3. Мозалевский А.Ф., Травянка Т.Д., Яковлев А.А. и др. Состав метаболитов арахидоновой кислоты в крови и слюне детей с бронхиальной астмой //Укр.биохим. ж. 1997; 69:162-168
4. Сидоренко Г.И., Зборовский Э.И., Левина Д.И. Поверхностно-активные свойства конденсата выдыхаемого воздуха (новый метод для изучения легочной функции) //Тер. Архив 1980; 52: 65-68
5. Таганович А.Д. Исследование сурфактантной системы легких с помощью биохимических методов //Пульмонология 1996, № 1.-С.45-50.
6. Antczak A, Nowak D, Bialasiewicz P, Kasielski M. Hydrogen peroxide in expired air condensate correlates positively with early steps of peripheral neutrophil activation in asthmatic patients. Arch Immunol Ther Exp (Warsz.) 1999; 47:119-126.
7. Antczak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, Piasecka G, Kurmanowska Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. Eur Respir J 1997; 10:1235-1241.
8. Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketani LH, Boxer LA, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. Lancet 1986; 1:11-14.
9. Becher G, Winsel K, Beck E, Neubauer G, Stresemann E. Breath condensate as a method of noninvasive assessment of inflammation mediators from the lower airways. Pneumologie 1997; 51 Suppl 2:456-9:456-459.
10. Collins CE, Quaggiotto P, Wood L, O'Loughlin EV, Henry RL, Garg ML. Elevated plasma levels of F2 alpha isoprostane in cystic fibrosis. Lipids 1999; 34:551-556.
11. Dekhuijzen PN, Aben KK, Dekker I, et al. Increased Atemkondensation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154:813-816.

12. Dohlman, A. W., Black, H. R., and Royall, J. A. Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 148, 955-960. 1993.
13. Dworski R, Murray JJ, Jacksonroberts L, et al. Allergen-induced synthesis of F(2)-isoprostanes in atopic asthmatics. Evidence for oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1947-1951.
14. Formanek W., Inci D., Laurener R.P. et al. Elevated Nitrite in Breath Condensates of Children with Respiratory Disease // *Eur. Respir. J.* 2002; 19: 487-491
15. Garey, K. W., Neuhauser, M. M., Rafice, A. L., Robbins, R. A., Danziger, L. H., and Rubinstein, I. Protein, nitrite/nitrate, and cytokine concentration in exhaled breath condensate of young smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 161, A175. 2000.
16. Gaston B, Sears S, Woods J, et al. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. *Lancet* 1998; 351:1317-1319.
17. Grasemann H., Michler E., Wallot M., Ratjen F. Decreased Concentration of Exhaled Nitric Oxide (NO) in Patients with Cystic Fibrosis // *Pediatric Pulmonol* 1997; 24: 173-177
18. Hanazawa, T., Kharitonov, S. A., Oldfield, W., Kay, A. B., and Barnes, P. J. Nitrotyrosine and cystenyl leukotrienes in breath condensates are increased after withdrawal of steroid treatment in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161, A919. 2000.
19. Heard SO, Longtine K, Toth I, Puyana JC, Potenza B, Smyrniotis N. The influence of liposome-encapsulated prostaglandin E1 on hydrogen peroxide concentrations in the exhaled breath of patients with the acute respiratory distress syndrome. *Anesth Analg* 1999; 89:353-357.
20. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53:680-684.
21. Horvath I, Donnelly LE, 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.
22. Hunt J, Byrns RE, Ignarro LJ, Gaston B. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma. *Lancet* 1995; 346:1235-1236.
23. Jübsis, Q., Raatgeep, H. C., Schellekens, S. L., Hop, W. C. J., Hermans, P. W. M., and de Jongste, J. C. Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J* 12, 483-485. 1998.
24. Kharitonov S.A., Barnes P.J. Exhaled Markers of Pulmonary Disease // *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1693-1722
25. Kharitonov, S. A., Donnelly, L. E., Corradi, M., Montuschi, P., and Barnes, P. J. Dose-dependent onset and duration of action of 100/400 mcg budesonide on exhaled nitric oxide and related changes in other potential markers of airway inflammation in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161, A186. 2000.
26. Kharitonov, S. A., Sapienza, M. A., Barnes, P. J., and Chung, K. F. Prostaglandins E2 and F2a reduce exhaled nitric oxide in normal and asthmatic subjects irrespective of airway calibre changes. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 1374-1378. 1998.
27. Kuitert LM, Newton R, Barnes NC, Adcock IM, Barnes PJ. Eicosanoid mediator expression in mononuclear and polymorphonuclear cells in normal subjects and patients with atopic asthma and cystic fibrosis. *Thorax* 1996; 51:1223-1228.
28. Leff AR. Role of leukotrienes in bronchial hyperresponsiveness and cellular responses in airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:S125-S132
29. Linnane S.J., Keatings V.M., Costello C.M. et al. Total Sputum Nitrate plus Nitrite is Raised during Acute Pulmonary Infection in Cystic Fibrosis // *Am J Respir Crit Care Med*

1998; 158: 207-212

30. Loukides, S., Horvath, I., Wodehouse, T., Cole, P. J., and Barnes, P. J. Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 991-994. 1998.
31. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-Isoprostane, a Marker of Oxidative Stress, in Exhaled Condensate of Asthma Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:216-220.
32. Montuschi, P., Corradi, M., Ciabattoni, G., Kharitonov, S. A., and Barnes, P. J. 8-isoprostane in breath condensate is increased in healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 159, A887. 1999.
33. Montuschi, P., Corradi, M., Ciabattoni, G., van Rensen E.L, Collins, J.V., Kharitonov, S. A., and Barnes, P.J. Breath condensate analysis of 8-isoprostane: a new approach for assessment of oxidative stress in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 159, A798. 1999.
34. Montuschi, P., Kharitonov, S. A., Carpagnano, E., Culpitt, S., Russell, R., Collins, J. V., and Barnes, P. J. Exhaled prostaglandin E2: a new biomarker of airway inflammation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 161, A821. 2000.
35. Nowak D, Antczak A, Krol M, et al. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J* 1996; 9:652-657.
36. Nowak D, Kasielski M, Pietras T, Bialasiewicz P, Antczak A. Cigarette smoking does not increase hydrogen peroxide levels in expired breath condensate of patients with stable COPD. *Monaldi Arch Chest Dis* 1998; 53:268-273.
37. Reinhold P, Langenberg A, Becher G, Rothe M. Breath condensate—a medium obtained by a noninvasive method for the detection of inflammation mediators of the lung. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1999; 112:254-259.
38. Rowe BH, Bretzlaff JA, Bourdon C, Bota GW, Camargo CAJ. Magnesium sulfate for treating exacerbations of acute asthma in the emergency department. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;
39. Scheideler L, Manke HG, Schwulera U, Inacker O, Hammerle H. Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool? *Am Rev. Respir Dis* 1993; 148:778-784.
40. Stamler JS. S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. [Review]. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 1995; 196:19-36.
41. Taha R, Olivenstein R, Utsumi T, et al. Prostaglandin H Synthase 2 Expression in Airway Cells from Patients with Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:636-640.
42. Zetterquist, W., Pedroletti, C., Lundberg, J. O. N., and Alving, K. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 13, 327-333. 1999.