

Bolesław Kalicki, Ludmiła Bartoszewicz, Anna Jung,
Janusz Żuber, Agnieszka Rustecka, Andrzej Fal

Received: 03.12.2009

Accepted: 09.12.2009

Published: 31.12.2009

Porównanie stężeń tlenu azotu w powietrzu wydychanym i pH kondensatu powietrza wydychanego u dzieci chorych na astmę i zdrowych

Comparison of nitric oxide in exhaled air and pH of exhaled breath condensate in healthy children and children with asthma exacerbation

Klinika Pediatrii, Nefrologii i Alergologii Dziecięcej WIM, Warszawa. Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Anna Jung
Correspondence to: Klinika Pediatrii, Nefrologii i Alergologii Dziecięcej CSK MON WIM, ul. Szaserów 128, 00-909 Warszawa, tel.: 22 681 72 36

Source of financing: Department own sources

Streszczenie

Istotą astmy jest proces zapalny toczący się w śluzówce drzewa oskrzelowego. Parametry oceniające nasilenie tego procesu stosowane do tej pory są mało obiektywne i trudne do uzyskania, zwłaszcza u dzieci. Możliwość rzetelnej oceny intensywności tego procesu wpłynęłaby na dokładniejszą diagnozę pacjenta i zobiektywizowałaby postępowanie lecznicze. W ostatnim okresie ukazało się wiele prac poświęconych poszukiwaniu takich narzędzi, które w łatwy, nieinwazyjny i tani sposób odzwierciedlały stan zapalny w układzie oddechowym. Za jeden z takich wykładników uznawany jest pomiar stężenia tlenu azotu (NO) w wydychanym powietrzu. Jego stężenie zależy od aktywności iNOS – enzymu aktywowanego między innymi przez czynniki zapalne. Oznacza się go metodami chemiluminescencyjnymi. Wzrost stężenia sugeruje nasilenie zapalenia oskrzeli. Innym markerem stanu zapalnego brany pod uwagę w wielu badaniach jest pH kondensatu powietrza wydychanego (KPW), który jest pochodną płynu pokrywającego powierzchnię pęcherzyków płucnych. Spośród wielu substancji w nim rozpuszczonych oznaczanie jego pH jest najłatwiejszą metodą analizy KPW. Zauważono, że pH tego płynu spada w chorobach przebiegających z nasileniem stanu zapalnego w płucach. Obie wymienione metody są stosunkowo tanie i proste do zastosowania (również w populacji dziecięcej). Celem niniejszego badania była ocena stężeń NO w powietrzu wydychanym i pH KPW u dzieci z rozpoznaną astmą w okresie zaostrzenia choroby i porównanie tych wyników z wartościami uzyskanymi w grupie dzieci zdrowych. Do badań włączono 26 dzieci w wieku od 8 do 17 lat. Pomiędzy obiema grupami dzieci – zdrowych i chorych, uzyskano statystycznie znamiennej różnicę wyników zarówno stężenia NO w powietrzu wydychanym, jak i pH KPW. W przypadku zaostrzenia astmy stężenie NO rosło, a pH KPW malało, oba parametry korelowały ze sobą. Wyniki te pozostają w zgodzie z innymi badaniami posługującymi się tymi metodami do oceny stanu zapalnego w oskrzelach. Sugeruje to, że mogą stać się cennymi i powszechnie używanymi metodami oceny astmy.

Słowa kluczowe: astma, kondensat powietrza wydychanego (KPW), tlenek azotu (NO), pH kondensatu powietrza wydychanego, zaostrzenie astmy

Summary

Basic pathogenic mechanism of asthma is an inflammatory process taking place in a mucous membrane of a bronchial tree. Parameters, used to evaluate this process so far, aren't objective enough and they are difficult to gain, especially in children. The possibility of an objective estimation of the inflammatory process in bronchial tree can influence more appropriate evaluation of a patient's condition and make treatment of asthma more adequate. There were many researches published in last few years, seeking for such tools, which in an easy, noninvasive and cheap way would reflect the intensification of inflammation in respiratory system. Nitric oxide (NO) concentration in exhaled air is considered as one of such indicators. Its concentration depends on iNOS activity – an enzyme activated by inflammatory factors. It is measured with methods using chemiluminescence. Rise in its concentration suggests rise in inflammatory process of bronchia. The other marker of inflammatory state taken into consideration in many researches is pH of exhaled breath condensate (EBC), which is a deriva-

tive of fluid lining a surface of pulmonary alveoli. It is possible to measure concentration of many substances dissolved in it, but pH estimation is the easiest method of EBC evaluation. It was noticed that it falls in the run of diseases that go with inflammation in bronchial tree. Both mentioned methods are relatively cheap and easy to accomplish, even among pediatric population. The aim of this study was to evaluate NO and pH values in EBC in 17 children with asthma diagnosis and comparison of the results with values collected from a group of healthy children. Investigation was conducted at 26 children in the age from 8 to 17 year old. Between both groups of children it was gained statistically significant difference in values of NO concentration in exhaled air as well as pH of EBC. In the case of asthma exacerbation NO concentration was rising and pH value was falling, and both this parameters were correlating with each other. These results remain consistent with other researches using same parameters as indicators of bronchial and pulmonary inflammatory process intensification. They can become valuable and commonly used methods of evaluation of asthma.

Key words: asthma, exhaled breath condensate, nitric oxide (NO), pH of exhaled breath condensate, asthma exacerbation

Astma jest stanem chorobowym, w którym podstawową rolę w patogenezie odgrywa przewlekły stan zapalny oskrzeli. Zmiany zapalne oskrzeli wywołują ich nadwrażliwość. Ciężkość choroby ocenia się na podstawie objawów klinicznych i badania spirometrycznego jako wykładników stopnia obturacji oraz odpowiedzi klinicznej na zastosowane leczenie⁽¹⁾. Od tej oceny zależy dalsze postępowanie z pacjentem, dobór odpowiedniego leczenia oraz przewidywanie zaostrzeń. Parametry te nie odzwierciedlają jednak w pełni nasilenia procesu toczącego się w oskrzelach, ponieważ nie są bezpośrednimi wykładnikami stanu zapalnego. Dodatkowo w populacji dziecięcej ocena kliniczna jest bardzo trudna – zależy od subiektywnej interpretacji objawów przez rodzica, a badanie spirometryczne z powodu braku współpracy z dzieckiem jest często problematyczne bądź do przeprowadzenia, bądź do interpretacji. Trwają poszukiwania wykładników, które informowałyby o stanie zapalnym w sposób bezpośredni, obiektywny i łatwy do oceny. Za taki wykładnik uznaje się stężenie NO w powietrzu wydychanym⁽²⁾. Astma rozwija się w sytuacji zaburzenia równowagi pomiędzy wydzielanymi cytokinami biorącymi udział w rozwoju stanu zapalnego. Wynika ono z dysproporcji funkcjonalnej i ilościowej poszczególnych komórek układu immunologicznego. U osób ze skłonnością do alergii wyraźna jest przewaga limfocytów Th2 nad Th1. Limfocyty Th2 wydzielają m.in. IL-4, IL-5 i IL-13, które są odpowiedzialne za rozwój stanu zapalnego w drogach oddechowych⁽¹⁾. Zwłaszcza IL-4 jest silnym sygnałem wywołującym pojawienie się indukowanej syntetazy tlenu azotu (iNOS) w komórkach fagocytarnych (neutrofilach, makrofagach, monocytach)⁽²⁾. IL-4 jest odpowiedzialna za wytwarzanie tlenu azotu z argininy oraz tlenu i powoduje, że w trakcie zaostrzenia stanu zapalnego NO jest wydzielany do dróg oddechowych w zwiększonych ilościach. Dodatkowo w przebiegu astmy zmniejszona jest ilość kolejnej generacji z puli komórek CD4+ – Treg. Wydzielają one IL-10 oraz TGF- β , które działają jak silne inhibitory produkcji iNOS. Jako gaz NO jest obecny w powietrzu wydychanym i można zmierzyć

jego ilość za pomocą metod chemiluminescencyjnych czy elektrochemicznych. Uznaje się, że jego stężenie koreluje z nasileniem stanu zapalnego w oskrzelach⁽²⁾.

W latach 80. opisano technikę zbierania kondensatu powietrza wydychanego (KPW), który jest pochodną płynu pokrywającego komórki pęcherzyków płucnych⁽³⁾. Można go uzyskać w dość prosty sposób, a wymagania dotyczące współpracy pacjenta są niewielkie (co ma znaczenie u dzieci i młodzieży). Od tego czasu rośnie liczba badań nad wykorzystaniem tego materiału. Próbuje się oznaczać w nim szereg biomarkerów (cytokin, jonów) i odnosić do stanu zapalnego drzewa oskrzelowego⁽³⁻⁸⁾. Ponieważ ich stężenia są skrajnie niskie, potrzebne są bardzo czułe metody ich oznaczania⁽⁷⁾. W 2000 roku Hunt i wsp.⁽⁹⁾ zauważyli, że pH koncentratu maleje w stanach zaostrzenia astmy.

Celem badania była ocena stężeń NO w powietrzu wydychanym i pH KPW u dzieci z astmą oraz porównanie ich z wartościami uzyskanymi w grupie dzieci zdrowych.

MATERIAŁ

Do badań włączono 26 dzieci w wieku od 8 do 17 lat, pozostających pod opieką Kliniki Pediatrii, Nefrologii i Alergologii Dziecięcej Wojskowego Instytutu Medycznego. Siedemnaścioro dzieci (12 chłopców, 5 dziewcząt) w wieku od 8 do 16 lat (średnia wieku 11 lat) miało rozpoznaną astmę potwierdzoną pełną dokumentacją kliniczną. Badania przeprowadzono u nich w okresie zaostrzenia astmy o różnym stopniu nasilenia, przed włączeniem

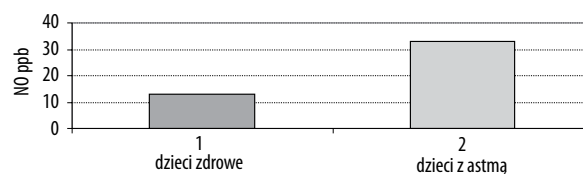


Tabela 1. Porównanie średnich wartości stężenia NO w wydychanym powietrzu u dzieci zdrowych i z rozpoznaną astmą

leczenia. Wszyscy pacjenci byli stabilni klinicznie. Grupę kontrolną stanowiło 9 zdrowych dzieci (4 chłopców, 5 dziewcząt) w wieku od 11 do 17 lat (średnia wieku 16 lat).

METODA

U wszystkich dzieci pomiary wykonywano w trakcie zaostrzenia choroby lub w pierwszych dniach po opanowaniu obturacji (gdy możliwe było wykonanie pomiaru), zawsze na czczo. Badanie rozpoczynano od pomiaru stężenia NO w powietrzu wydychanym za pomocą aparatu NIOX MINO firmy Aerocrine zgodnie z przyjętymi zasadami. Bezpośrednio po tym oznaczeniu wykonywano badanie spirometryczne. Następnie przez 15 minut zbierano KPW za pomocą aparatu firmy Jaeger w trakcie spokojnego oddechu. Natychmiast po uzyskaniu kondensatu mierzono jego pH, wykorzystując pH-metr firmy ELMETRON, odczytu dokonywano po ustabilizowaniu się wartości.

WYNIKI

W grupie dzieci z astmą stężenie NO w powietrzu wydychanym wynosiło średnio 33 ppb (SD=31,259; wartości od 9 do 107 ppb) i było wyższe niż w grupie dzieci zdrowych, w której średnia wartość NO wynosiła 13 ppb (SD=3,77; wartości od 8 do 19 ppb). Różnica w obu grupach była statystycznie znamienna ($p<0,01$) (tabela 1). Średnia wartość pH KPW u dzieci z astmą wynosiła 5,590 (SD=0,432; wartości od 4,177 do 6,034) i była niższa niż u dzieci zdrowych, u których wartość pH KPW równa była 5,948 (SD=0,177; wartości od 5,636 do 6,203). Różnica była statystycznie znamienna ($p<0,005$) (tabela 2).

OMÓWIENIE

W przebiegu zaostrzenia astmy oskrzelowej dochodzi zarówno do wzrostu stężenia NO w powietrzu wydychanym, jak i do obniżenia wartości pH KPW. W wielu badaniach wskazuje się na tlenek azotu jako dobry biomarker nasilenia stanu zapalnego w przebiegu astmy⁽¹⁰⁻¹²⁾. Wydzielanie NO w płucach jest prowokowane przez mediatory stanu zapalnego, zwłaszcza IL-4

pochodzącą z limfocytów Th2, która doprowadza do aktywacji iNOS (indukowanej syntetazy tlenku azotu). Wykazano, że produkcja tlenku azotu wzrasta proporcjonalnie do nasilenia stanu zapalnego^(1,2). Korelacja pomiędzy nasileniem stanu zapalnego w drogach oddechowych a stężeniem NO w powietrzu wydychanym została wykazana w badaniach, gdzie wysokie stężenia NO przed rozpoznaniem astmy obniżyło się po leczeniu kortykosteroidami. W badaniu tym stwierdzono również korelację między stężeniem NO a liczbą eozynofili w płwocinie indukowanej⁽¹³⁾. Obecne badania przedstawione w niniejszej pracy także wskazują, że stężenie tlenku azotu w powietrzu wydychanym jest znamienne wyższe u dzieci z zaostrzeniem astmy w porównaniu z dziećmi zdrowymi. Pomimo toczącej się dyskusji nad kliniczną przydatnością oznaczania stężenia NO, jest ono powszechnie stosowane zarówno w badaniach naukowych, jak i w obiektywnej ocenie nasilenia stanu zapalnego dróg oddechowych⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Podobnie jak stężenie NO w powietrzu wydychanym, pH KPW stanowi wykładnik nasilenia stanu zapalnego dolnych dróg oddechowych. Według Hunta i wsp.⁽¹⁷⁾ zakwaszenie jest wynikiem spadku aktywności glutaminy i produkcji NH_3 , a tym samym spadku lokalnych możliwości buforowych KPW⁽⁷⁾. W kolejnych badaniach opisywano spadek pH w kondensacie w przebiegu różnych chorób, które cechuje nasilony stan zapalny w drogach oddechowych: przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, astmie, mukowiscydozie, a także w przebiegu odrzucania przeszczepu płuc^(9,18-20). Zbliżone obserwacje dotyczyły wyników badań własnych, gdzie znamienne obniżenie wartości pH obserwowano w grupie dzieci z zaostrzeniem astmy. Pomiary pH KPW wg badań Koczulli i wsp. oraz innych autorów są powtarzalne, niezależnie od urządzenia stosowanego do zbierania kondensatu^(3,7).

Szereg wątpliwości dotyczy zanieczyszczenia próbki KPW jonami amonowymi pochodzącymi ze śliny oraz kropelkami treści żołądkowej w przebiegu refluku żołądkowo-przełykowego. Mimo to istnieją badania wykazujące korelację pomiędzy zakwaszeniem KPW a niezależnymi wykładnikami stanu zapalnego dróg oddechowych^(3,6,9). W badaniu własnym zaobserwowano korelację pomiędzy spadkiem pH KPW i wzrostem stężenia NO powietrza wydychanego u chorych z zaostrzeniem astmy. Wartości te różniły się znamienne w porównaniu z wartościami u zdrowej populacji. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami badań innych autorów oceniających pH kondensatu w korelacji z innymi wykładnikami nasilenia stanu zapalnego^(3,4,9,18-21).

Z przeprowadzonego badania wynika, że oba parametry są równie wartościowe w określeniu nasilenia stanu zapalnego dróg oddechowych i mogą być zamiennie wykorzystywane w ocenie ciężkości zaostrzenia astmy. Obie metody są nieinwazyjne i stosunkowo proste do przeprowadzenia w populacji dziecięcej.

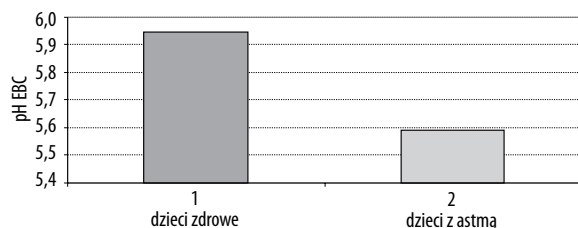


Tabela 2. Porównanie średnich wartości pH w kondensacie powietrza wydychanego u dzieci zdrowych i z rozpoznaną astmą

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Światowa strategia rozpoznawania, leczenia i prewencji astmy – aktualizacja 2006. Med. Prakt. 2007; 1 (wydanie specjalne).
2. Guo F.H., Comhair S.A., Zhang S. i wsp.: Molecular mechanisms of increased nitric oxide in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. J. Immunol. 2000; 164: 5970-5980.
3. Koczulla R., Dragonieri S., Schot R. i wsp.: Comparison of exhaled breath condensate pH using two commercially available devices in healthy controls, asthma and COPD patients. Respir. Res. 2009; 10: 78.
4. Niimi A., Nguyen L.T., Usmani O. i wsp.: Reduced pH and chloride levels in exhaled breath condensate of patients with chronic cough. Thorax 2004; 59: 608-612.
5. Steiss J., Rudolf S., Landmann E.: Effect of inhaled corticosteroid treatment on exhaled breath condensate leukotriene E₄ in children with mild asthma. Allergy Asthma Proc. 2008; 29: 371-375.
6. Kielbasa B., Moeller A., Sanak M.: Eicosanoids in exhaled breath condensates in the assessment of childhood asthma. Pediatr. Allergy Immunol. 2008; 19: 660-669.
7. Effros M., Dunning M.B., Biller J.: The promise and perils of exhaled breath condensates. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2004; 287: L1073-L1080.
8. Kalicki B., Jung A., Grad A. i wsp.: Czy oznaczanie stężenia tlenku azotu (NO) i IL-4 w kondensacie powietrza wydychanego może być wykorzystane w ocenie zaostrzeń i leczeniu astmy u dzieci? Współczesna Alergologia Info 2008; 3: 112-119.
9. Hunt J., Fang K., Malik R.: Endogenous airway acidification – implications for asthma pathophysiology. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 161: 694-699.
10. Olivieri M., Talamini G., Corradi M. i wsp.: Reference values for exhaled nitric oxide (reveno) study. Respir. Res. 2006; 7: 94.
11. Smith A.D., Cowan J.O., Brassett K.P. i wsp.: Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. N. Engl. J. Med. 2005; 352: 2163-2173.
12. Shaw D.E., Berry M.A., Thomas M. i wsp.: The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomised controlled trial. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007; 176: 231-237.
13. Rodway G.W., Choi J., Hoffman L.A., Sethi J.M.: Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma: clinical implications. Chron. Respir. Dis. 2009; 6: 19-29.
14. Shaw D.: Exhaled nitric oxide: time to employ or make redundant? Chron. Respir. Dis. 2009; 6: 3-4.
15. Farha S., Asosingh K., Laskowski D. i wsp.: Effects of the menstrual cycle on lung function variables in women with asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2009; 180: 304-311.
16. Ohkura N., Fujimura M., Tokuda A. i wsp.: Evaluation of airway hyperresponsiveness and exhaled nitric oxide as risk factors for airway remodeling in patients with stable asthma. Allergy Asthma Proc. 2009; 30: 419-423.
17. Hunt J.F., Erwin E., Palmer L. i wsp.: Expression and activity of pH-regulatory glutaminase in the human airway epithelium. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002; 165: 101-107.
18. Brunetti L., Francavilla R., Tesse R.: Exhaled breath condensate cytokines and pH in pediatric asthma and atopic dermatitis. Allergy Asthma Proc. 2008; 29: 461-467.
19. Kostikas K., Papatheodorou G., Ganas K. i wsp.: pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002; 165: 1364-1370.
20. Gessner C., Hammerschmidt S., Kuhn H. i wsp.: Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury. Respir. Med. 2003; 97: 1188-1194.
21. Carpagnano G.E., Barnes P.J., Francis J. i wsp.: Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: a new noninvasive marker of airway inflammation? Chest 2004; 125: 2005-2010.