

Э.Х.Анаев, А.Г.Чучалин

Конденсат выдыхаемого воздуха в диагностике и оценке эффективности лечения болезней органов дыхания

ФГУ НИИ пульмонологии Росздрава, г. Москва

E.Kh.Anaev, A.G.Chuchalin

Exhaled breathy condensate in diagnosis of respiratory disease and evaluation of treatment efficacy

Summary

Investigation of exhaled breath condensate (EBC) is one of the most promising directions of pneumology. Today it has been actively implementing in clinical practice. The aim of the present work was complex analysis of EBC in health and in patients with airway inflammation and assessment of treatment efficacy of respiratory disease.

The study involved 615 patients with various inflammatory lung diseases, 102 healthy volunteers and 51 smokers without lung pathology. EBC was collected using the standardized method with ECoScreen equipment (Erich Jaeger, Germany). We measured EBC volume, pH, sodium, potassium and calcium concentrations, hydrogen peroxide level, activities of neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G in EBC.

Compared to healthies, patients with respiratory pathology had in average EBC volume higher and pH significantly lower. Treatment of pneumonia, asthma and COPD resulted in reliable increase of pH. EBC sodium concentration was significantly higher in most lung diseases; potassium concentration was higher in COPD patients. The latter had the lowest level of calcium in EBC. All the respiratory patients had hydrogen peroxide level significantly higher compared to the healthy controls and the smokers. Proteinase levels were higher in the smokers and the "bronchitic" COPD patients compared to the "emphysematous" COPD patients and the healthy controls.

Therefore, the complex analysis of EBC is a non-invasive method evaluating morphological and functional status of the respiratory system. EBC pH and hydrogen peroxide are sensitive markers of airway inflammation which can be used to assess the inflammation severity and efficacy of treatment.

Резюме

В настоящее время исследование конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) является одним из наиболее перспективных направлений в пульмонологии и активно внедряется в клиническую практику. Целью настоящей работы явились комплексное изучение КВВ у здоровых людей и пациентов с воспалительными заболеваниями органов дыхания и оценка эффективности проводимого лечения.

Были обследованы 615 больных с различными воспалительными заболеваниями легких, 102 здоровых добровольца и 51 курильщик без патологии легких. КВВ собирали стандартизованным методом с помощью аппарата ECoScreen (Erich Jaeger, Германия). Определяли уровень pH, объем КВВ, концентрацию натрия, калия и кальция, пероксида водорода, а также активность нейтрофильной эластазы, протеиназы 3 и катепсина G в КВВ.

Средний уровень pH КВВ при патологии органов дыхания был значимо ниже, а средний объем КВВ был выше, чем у здоровых людей. После лечения у больных пневмонией, бронхиальной астмой (БА) и ХОБЛ уровень pH КВВ значимо увеличился. Концентрация натрия в КВВ была достоверно выше при большинстве болезней легких, а калия — при ХОБЛ. Наименьшая концентрация кальция в КВВ обнаружена также у больных ХОБЛ. Во всех группах больных с патологией легких содержание пероксида водорода в КВВ было значительно выше по сравнению со здоровым контролем и курильщиками. Концентрация протеиназ в КВВ у курильщиков и при бронхитическом типе ХОБЛ была выше, чем у больных с эмфизематозным типом и у здоровых людей.

Таким образом, комплексное исследование КВВ — неинвазивный метод, позволяющий оценить морфо-функциональное состояние респираторной системы при воспалительных заболеваниях органов дыхания. Уровень pH и концентрация пероксида водорода в КВВ являются чувствительными маркерами активности воспаления дыхательных путей при патологии легких, определение которых можно использовать для оценки степени выраженности воспаления и эффективности проводимого лечения.

Традиционные методы оценки активности воспаления в дыхательных путях включают анализ обычной и индуцированной мокроты, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и бронхобиопсий [1]. Индуцирование мокроты ингаляциями гипертонического раствора хлорида натрия может изменять состав получаемых образцов, а также вызывать бронхokonстрикцию [2]. Для получения БАЛ и бронхобиоптатов необходимо проведение бронхоскопии, которая является инвазивным травматичным методом, вследствие чего ее нельзя проводить у тяжелых больных, детей и в амбулаторной практике.

Этим можно объяснить растущий интерес к анализу конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) — простому неинвазивному методу оценки степени

воспаления дыхательных путей, способствующему диагностике заболеваний органов дыхания и оценке эффективности проводимого лечения. В настоящее время исследование КВВ является одним из наиболее перспективных направлений в пульмонологии и активно внедряется в клиническую практику.

Влаговыведительная функция легких тесно связана с продукцией в альвеолах и бронхах жидкого секрета, избыток жидкости из которого абсорбируется эпителием верхних дыхательных путей. Абсорбция жидкости этими сегментами дыхательных путей является результатом согласованной работы ионтранспортирующих систем, осуществляющих в клетках дыхательного эпителия процессы абсорбции и секреции хлорида натрия и осмотически свободной

воды [3]. Следовательно, КВВ имеет определенный ионный состав, который отражает эти процессы.

Ведущим патогенетическим механизмом развития и прогрессирования большинства болезней легких является воспаление дыхательных путей, которое сопровождается дисбалансом в системах оксиданты-антиоксиданты и протеолиз-антипротеолиз. При этом изменяется состав жидкости, выстилающей эпителий дыхательных путей, которая содержит большое количество летучих и нелетучих биологически активных веществ [1]. Большая часть этих соединений может быть использована в качестве биомаркеров состояния эпителия дыхательных путей при бронхиальной астме (БА), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), идиопатическом легочном фибриозе (ИЛФ) и других заболеваниях органов дыхания.

Методы определения биомаркеров в КВВ постоянно совершенствуются, разрабатываются более чувствительные и селективные методы, в частности с использованием сенсоров для детекции низких концентраций пероксида водорода. В литературе отсутствуют публикации, посвященные комплексной оценке состава КВВ и определению его протеолитической активности при патологии легких.

Целью настоящей работы явились комплексное изучение КВВ у здоровых людей и пациентов с воспалительными заболеваниями органов дыхания и оценка эффективности проводимого лечения.

Материал и методы

Были обследованы 615 больных (371 мужчина и 244 женщины, из них 250 — курящие, 95 — бывшие курильщики) с различными воспалительными заболеваниями легких, которые находились на стационарном лечении в ГКБ № 57 г. Москвы в связи с обострением заболевания, а также наблюдались амбулаторно в ФГУ НИИ пульмонологии Росздрава. Контрольную группу составили 153 здоровых добровольца (84 мужчин и 69 женщин), из них 51 были курильщиками с индексом курящего человека (ИКЧ) более 1 пачко-лет, у которых при спирометрии нарушений легочной функции не выявлено. Распределение обследованных групп по полу, возрасту и статусу курения приведено в табл. 1.

Таблица 1
Характеристика обследованных групп

Группы	N	Пол, муж. / жен.	Средний возраст, лет	Курящие / экс-курильщики
Здоровые	102	53 / 49	23,7 ± 5,6	0 / 0
Курильщики	51	31 / 20	23,5 ± 3,6	51 / 0
БА	131	62 / 69	51,6 ± 14,3	36 / 16
ХОБЛ	205	169 / 36	61,5 ± 10,4	102 / 66
Пневмония	142	96 / 46	44,2 ± 16,0	95 / 4
ИЛФ	72	14 / 58	56,2 ± 9,8	9 / 4
Бронхоэктазы	43	20 / 23	52,7 ± 15,1	8 / 4
Муковисцидоз	22	10 / 12	21,8 ± 4,4	0 / 1

У 131 обследованного пациента в возрасте от 17 до 78 лет была БА, у 75 из которых была диагностирована стадия обострения заболевания, а у 56 больных — стадия ремиссии. С ХОБЛ обследованы 205 пациентов (возраст — 39–87 лет), стадия обострения была диагностирована у 124 пациентов, а стадия ремиссии — у 81 больного. С внебольничной пневмонией (ВП) обследованы 142 пациента в возрасте от 17 до 78 лет. Бронхоэктазы были обнаружены у 43 пациентов в возрасте от 20 до 73 лет. С диагнозом ИЛФ были обследованы 72 пациента в возрасте 32–79 лет. С легочно-кишечной формой муковисцидоза обследованы 22 пациента в возрасте от 17 до 31 года, среди которых с обострением заболевания было 10 больных и 12 человек — вне обострения.

Диагностика заболеваний органов дыхания осуществлялась на основании общепринятых рекомендаций.

Клинико-инструментальное исследование включало сбор анамнеза и жалоб больного, оценку общего состояния и физикальных данных, лабораторно-инструментальные исследования (иммунологический анализ крови, пульсоксиметрия, компьютерная томография грудной клетки высокого разрешения (КТВР) и другие). Степень выраженности фиброзно-воспалительных изменений при КТВР (*HRCT Alveolar Score*) у больных с ИЛФ оценивали по *E.A. Kazerooni* (1997).

Исследование функции внешнего дыхания (ФВД) включало проведение спирографии, бодиплегизмографии и исследование диффузионной способности легких на аппарате *MasterScreen Body* фирмы *Erich Jaeger* (Германия). Исследование ФВД проводили в соответствии с рекомендациями *ERS*. Полученные результаты оценивали при сопоставлении данных с должными величинами, а их интерпретацию осуществляли с использованием общепринятых методических рекомендаций.

Сбор КВВ проводили в утренние часы после двукратного ополаскивания ротовой полости водой с помощью аппарата *ECoScreen* фирмы *Erich Jaeger* (Германия), снабженного клапанной системой, которая позволяет осуществлять вдох из окружающей атмосферы, а выдох — в устройство с конденсатором паров выдыхаемого воздуха. Вещества охлаждаются приблизительно до -10°C .

Сбор проводили в сидячем положении в течение 10 мин при спокойном дыхании обследуемого с использованием носового зажима. Измеряли объем собранного конденсата, и пробирки с материалом немедленно помещали в морозильник с температурой -70°C , где они хранились до проведения анализов.

Измерение pH КВВ проводили немедленно после сбора образца с использованием ф32 pH-метра (*Beckman*, США) со стеклянным микроэлектродом. Пациентам с БА, ХОБЛ и муковисцидозом измерения проводились в разные периоды течения болезни. Больным с ВП исследования проводили в динамике: исходно, на 4-й, 8-й и 12-й день стационарного лечения.

Определение объема КВВ проводили в группах здорового контроля и группах больных с патологией легких параллельно с определением уровня рН КВВ.

Концентрацию электролитов (натрия, калия, кальция) в КВВ измеряли сразу после размораживания образцов с помощью ионоселективных электродов на анализаторе *EasyLyte (Medica, США)*. Исследования проводились на базе ГНЦ РФ Института медико-биологических проблем РАН.

Содержание пероксида водорода в КВВ определяли совместно с лабораторией электрохимических методов кафедры аналитической химии химфака МГУ им. М.В.Ломоносова с помощью биоанализатора БИО 3 (Практик НЦ, г. Зеленоград, Россия). Для этого образцы немедленно после сбора замораживались в морозильнике при температуре -70°C , где хранились не более 7 сут. до проведения анализа. Для проведения анализа требуется 100 мкл образца, а время одного измерения составляет 1–1,5 мин.

В качестве сенсора использовали электроды на основе берлинской лазури (ферроцианида трехвалентного железа), которая является высокоэффективным электрокатализатором восстановления пероксида водорода. Планарный электрод, модифицированный берлинской лазурью, используется как амперометрический сенсор на пероксид водорода. При инжестировании образцов в ячейку анализатора формируется токовый отклик, прямо пропорциональный концентрации пероксида водорода в КВВ. Предел обнаружения составляет 10^{-7} М, а чувствительность анализа — $0,5 \text{ A} / \text{Mcm}^2$.

Определение активности нейтрофильной эластазы, протеиназы 3 и катепсина G в КВВ проводили спектрофлуориметрическим методом с использованием высокочувствительных и высокоселективных пептидных субстратов, разработанных профессором *Ф.Гомье* с сотрудниками [4]. Эксперименты с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа продуктов гидролиза и определения активности нейтрофильной эластазы, протеиназы 3 и катепсина G в КВВ были выполнены в лабораториях института *INSERM U-618* и факультета Медицины университета им. Франсуа Рабле (г. Тур, Франция).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ *Statistica 6.0* для *Windows*. Все численные данные представлены как *mean ± SD*. Достоверность различий одноименных показателей внутри одной группы определяли при помощи парного t-критерия. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Для выявления зависимости между показателями использовали линейный регрессионный анализ и метод Спирмена.

Результаты и их обсуждение

Уровень рН КВВ в группе здорового контроля составил в среднем $6,97 \pm 0,31$ и был значительно

выше, чем у пациентов с заболеваниями органов дыхания (рис. 1). У здоровых некурящих лиц уровень рН был достоверно выше, чем у курильщиков ($6,49 \pm 0,55$; $p < 0,0001$). Наименьшие значения рН обнаружены у больных с пневмонией (в период разгара заболевания) и у пациентов с ИЛФ ($5,96 \pm 0,37$ и $5,98 \pm 0,30$, соответственно; $p < 0,0001$ по сравнению со здоровым контролем). Не выявлено достоверных различий между уровнем рН у курильщиков и больных ХОБЛ ($6,49 \pm 0,55$ и $6,35 \pm 0,56$, соответственно; $p = 0,078$). У пациентов с БА уровень рН КВВ был значительно ниже, чем у больных с ХОБЛ ($6,16 \pm 0,52$ и $6,35 \pm 0,56$, соответственно; $p < 0,01$).

При исследовании уровня рН КВВ у больных с обострением БА и ХОБЛ обнаружены достоверно низкие значения этого показателя по сравнению с ремиссией этих заболеваний. У больных с обострением БА средний уровень рН КВВ составил $6,07 \pm 0,47$, а в период ремиссии был значительно выше и составил $6,39 \pm 0,49$ ($p = 0,00035$). При обострении ХОБЛ уровень рН КВВ также был значительно ниже, чем в период ремиссии заболевания ($6,14 \pm 0,50$ и $6,46 \pm 0,55$ соответственно; $p = 0,00007$). В нашем исследовании не обнаружено различий в уровне рН КВВ у больных с муковисцидозом в стадии обострения и вне обострения заболевания ($6,36 \pm 0,23$ и $6,34 \pm 0,23$; $p = 0,99$).

Наши результаты согласуются с литературными данными, в которых также обнаружены значимые низкие показатели рН КВВ у взрослых пациентов и детей с БА в стадии обострения и ремиссии заболевания по сравнению со здоровым контролем, в том числе и у пациентов, постоянно принимающих ингаляционные глюкокортикостероиды (иГКС) [5].

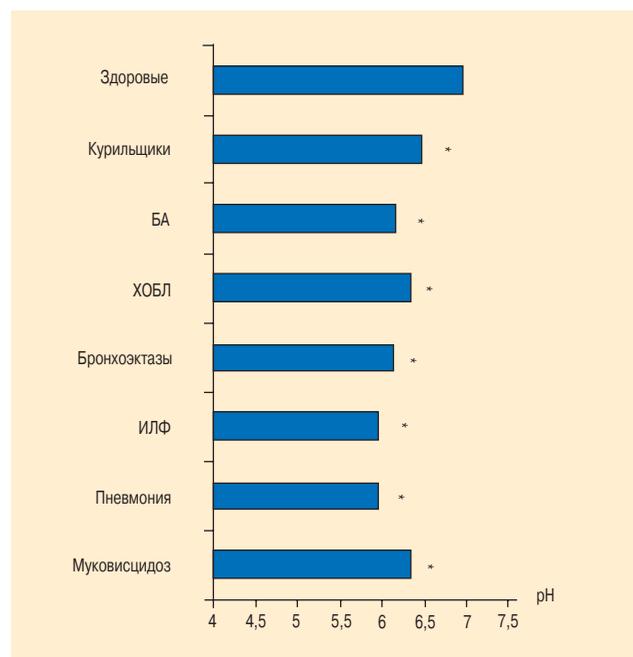


Рис. 1. Уровень рН КВВ у здоровых людей и больных с различными заболеваниями органов дыхания.

* — $p < 0,0001$ по сравнению со здоровыми людьми

У пациентов с обострением БА рН КВВ имеет достоверно низкие значения по сравнению со здоровым контролем и нормализуется при лечении ГКС, причем с утяжелением течения заболевания уровень рН КВВ становится еще ниже [6].

Однако, по мнению *J.Ojoo et al.* [7], уровень рН КВВ у взрослых больных и детей со стабильным или нестабильным течением БА достоверно не отличается от здорового контроля. В последнее время появились работы, указывающие на связь низкого уровня рН КВВ и респираторных симптомов с кислой аспирацией при гортанно-глоточном рефлюксе и гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) [8]. Хотя недавно было показано, что кашель у больных ГЭРБ не зависит от уровня рН КВВ [9].

Существуют противоречивые данные, показывающие значительно низкий уровень рН у больных со стабильным муковисцидозом и БА по сравнению со здоровыми субъектами [10]. Было также показано, что уровень рН КВВ у больных со стабильным муковисцидозом достоверно ниже, чем у здорового контроля, и становится еще ниже у пациентов в период обострения заболевания.

Таким образом, обострение ХОБЛ сопровождается меньшим снижением значений рН КВВ по сравнению с обострением БА. Измерение уровня рН КВВ при муковисцидозе, по нашим данным, не имеет диагностического значения в оценке обострения воспалительного процесса.

При оценке уровня рН КВВ у больных с неосложненной ВП исходно выявлялись низкие показатели рН КВВ — от 5,40 до 6,29 (в среднем $5,85 \pm 0,24$). Непараметрический анализ вариаций по Фриедману показал, что уровень рН КВВ на 4-й день лечения в стационаре имел тенденцию к повышению, а на 8-й день — достоверно увеличился до $6,13 \pm 0,23$ ($p = 0,00006$). На 12-й день лечения уровень рН КВВ оставался значительно выше по сравнению с исходным значением. Следовательно, увеличение значения рН КВВ при пневмонии является одним из определяющих показателей при оценке эффективности проводимого лечения.

Однако следует отметить, что уровень рН остается еще низким в фазе стабильного течения легочных заболеваний, а также у больных с пневмонией в период клинического выздоровления, не достигая значений как у здорового контроля. Это можно объяснить расстройствами кислотно-щелочного равновесия при отсутствии активного воспалительного процесса в дыхательных путях на момент обследования пациентов с той или иной легочной патологией.

При проведении корреляционного анализа у больных с ИЛФ была обнаружена достоверная корреляционная связь между уровнем рН КВВ и степенью фиброзно-воспалительных изменений паренхимы легких при КТВР ($r = -0,62$; $p = 0,01$) и с общей диффузией легких ($r = 0,51$; $p = 0,01$).

Таким образом, наши данные указывают на то, что показатель рН является чувствительным маркером

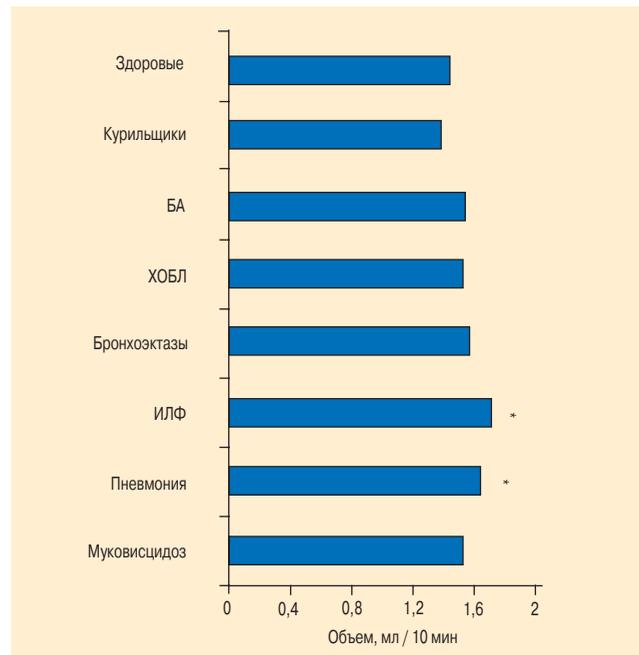


Рис. 2. Объем КВВ у здоровых людей и больных с различными заболеваниями органов дыхания
* — $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми людьми.

ром активности воспаления в дыхательных путях у всех больных с патологией органов дыхания. Динамическое определение уровня рН КВВ при пневмонии, БА и ХОБЛ можно использовать для оценки степени выраженности воспаления и эффективности проводимого лечения.

Средний объем КВВ у здоровых людей, курильщиков и пациентов с различными заболеваниями органов дыхания представлен на рис. 2. Как видно на рис. 2, объем КВВ у всех больных с патологией органов дыхания был выше, чем у здоровых. У курильщиков с ИКЧ менее 10 пачко-лет и нормальной функцией легких объем КВВ был ниже, чем в группе здоровых некурящих людей, однако разница была недостоверной ($p = 0,90$).

У пациентов с ИЛФ и пневмонией обнаружено значимое увеличение объема КВВ по сравнению со здоровым контролем (1,71 мл / 10 мин и 1,64 мл / 10 мин против 1,44 мл / 10 мин; $p < 0,005$). При сравнении группы курильщиков с группами больных, объем КВВ был значительно выше при БА, ХОБЛ, ИЛФ и пневмонии ($p < 0,04$). У курильщиков объем КВВ также был значительно ниже по сравнению с курящими пациентами, страдающими БА, ХОБЛ, бронхоэктазами и пневмонией ($p < 0,05$).

Наши результаты не согласуются с данными ряда исследователей, по мнению которых при воспалительных заболеваниях органов дыхания происходит снижение объема влаготери как в единице выдыхаемого воздуха, так и во времени, более значительное при ХОБЛ, чем при острой легочной патологии [11].

При оценке объема КВВ у больных с неосложненной ВП на 4, 8 и 12-й день лечения оказалось, что по сравнению с исходным значением он существенно не меняется. Также не обнаружено значимого из-

менения этого показателя в процессе лечения у пациентов с БА и ХОБЛ.

Известно, что количество КВВ зависит от показателей вентиляции легких, температуры выдыхаемого воздуха и влажности [12]. Было показано, что степень бронхиальной обструкции и использование сальбутамола у больных ХОБЛ и БА не влияют на объем собранного КВВ. Однако была обнаружена прямая связь между объемом КВВ и величиной дыхательного объема.

Таким образом, у больных с заболеваниями легких объем КВВ больше, чем у здоровых людей, особенно у курильщиков. Проводимое лечение и фаза течения заболеваний органов дыхания не влияют на влаговыведательную функцию легких.

При определении содержания натрия, калия и кальция в КВВ было установлено, что у здоровых людей и больных с патологией легких все элементы присутствуют в концентрациях, доступных для анализа (табл. 2). Доминирующим электролитом является натрий, содержание калия и кальция в КВВ, как и в сыворотке крови, было значительно ниже.

Концентрация натрия в КВВ у всех пациентов с заболеваниями органов дыхания была выше, чем у здорового контроля. Значимое повышение уровня натрия в КВВ по сравнению со здоровыми обнаружено у больных ИЛФ, ХОБЛ, БА и пневмонией ($p < 0,05$).

Содержание калия в КВВ у всех больных с заболеваниями легких имело тенденцию к повышению по сравнению со здоровыми людьми, и лишь у больных ХОБЛ разница была достоверной ($p = 0,004$).

Концентрация кальция в КВВ у здоровых людей оказалась выше, чем у пациентов с заболеваниями легких. Наименьшая концентрация обнаружена у больных ХОБЛ — $0,15 \pm 0,03$ ммоль / л. У больных БА, бронхоэктазами и ИЛФ уровень кальция в КВВ был также значительно ниже, чем у здоровых людей ($p < 0,05$).

Ранее было показано, что разгар воспалительного процесса в легочной ткани сопровождается изменением элементного состава КВВ, и большинство значений при этом меняются разнонаправлено. Снижение содержания электролитов в КВВ является следствием целого ряда патогенетически важных

процессов, происходящих при воспалении в легочной ткани. Повышенное выделение натрия и калия и уменьшение выделения кальция в КВВ при заболеваниях органов дыхания, скорее всего, отражают нарушение функции эпителия дыхательных путей, участвующего в продукции секрета, объем и состав которого определяется процессами абсорбции и секреции, связанными с трансэпителиальным переносом электролитов и воды.

Нами обнаружено, что у больных с пневмонией содержание натрия в КВВ существенно увеличивается, концентрация калия имеет тенденцию к повышению, а кальция — к уменьшению. В то время, как в разгар пневмонии происходит значительное снижение уровня натрия и кальция в КВВ. Оно может быть связано с их перераспределением в организме в ответ на развитие воспаления и выходом из тканевых депо, в том числе из легких, для обеспечения адекватной работы защитных и адаптационных систем [13].

При пневмонии патогенез развития отека пораженного участка ткани также связан с увеличением трансмембранного перемещения натрия и воды в интерстиций легких и пространство альвеол под действием ФНО- α и других цитокинов [14]. Эти процессы не могут не отразиться на составе КВВ. Повышенное разведение трахеобронхиального секрета, как первоисточника КВВ, приводит к некоторому снижению в нем минеральных веществ. Однако изменение градиента концентраций не может являться единственным патогенетическим механизмом, объясняющим снижение уровня биоэлементов.

Нами не обнаружено значимых колебаний уровня оцениваемых электролитов в КВВ при муковисцидозе. Это согласуется с данными *M. Griese et al.* [15], которые также не выявили различий в содержании натрия, калия и хлора в КВВ у больных муковисцидозом и БА при сравнении со здоровыми детьми.

Имеются данные о том, что нарушения нереспираторной функции легких могут опережать изменения показателей газообмена и гемодинамики у больных ХОБЛ и БА. Отсюда вытекает важность определения электролитов в КВВ для выявления патологии легких на начальных этапах ее возникновения, назначения адекватной терапии и контроля ее эффективности у таких больных.

Таким образом, было показано, что в КВВ наряду с измерением уровня рН можно определить содержание натрия, калия и кальция, указывающих на участие легких в минеральном обмене организма. Эпителий дыхательных путей участвует как в выведении воды, так и, возможно, электролитов из организма и, следовательно, в регуляции его водно-солевого гомеостаза. Различия в концентрации тех или иных электролитов в КВВ у здоровых людей и больных могут указывать на преимущественное привлечение тех или иных ионов в патогенезе различных легочных заболеваний. Незначительные нарушения метаболизма, обнаруженные при комплексном исследовании, позволяют диагностировать болезни лег-

Таблица 2
Концентрация электролитов в КВВ у здоровых добровольцев и больных с заболеваниями органов дыхания, ммоль / л

Группы	Натрий	Калий	Кальций
Здоровые	9,64 ± 0,27	0,27 ± 0,01	0,22 ± 0,06
БА	10,44 ± 0,90*	0,28 ± 0,02	0,17 ± 0,05*
ХОБЛ	10,56 ± 1,04*	0,29 ± 0,02*	0,15 ± 0,03**
Пневмония	10,29 ± 0,54*	0,29 ± 0,03	0,20 ± 0,06
ИЛФ	10,95 ± 0,70**	0,28 ± 0,01	0,19 ± 0,02*
Муковисцидоз	10,17 ± 1,05	0,31 ± 0,08	0,22 ± 0,05
Бронхоэктазы	10,00 ± 0,53	0,28 ± 0,01	0,16 ± 0,02*

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,0001$ по сравнению со здоровым контролем.

ких на ранней стадии и контролировать эффективность лечения.

Пероксид водорода был обнаружен во всех исследованных образцах КВВ. Концентрация пероксида водорода в КВВ у здоровых людей колебалась от 0,75 до 2,15 мкмоль / л и составила в среднем $1,67 \pm 0,37$ мкмоль / л. У курильщиков (ИКЧ менее 8 пачко-лет) с нормальной функцией легких отмечена тенденция к повышению концентрации пероксида водорода в КВВ по сравнению со здоровыми некурящими ($1,75 \pm 0,33$ мкмоль / л и $1,62 \pm 0,38$ мкмоль / л, соответственно; $p = 0,07$).

Повышение концентрации пероксида водорода в КВВ было обнаружено у курильщиков и экс-курильщиков. У курильщиков уровень пероксида водорода в КВВ был в 2,4 раза выше, чем у некурящих, и снижался до нормальных значений лишь через 2 нед. после прекращения курения [16].

Не обнаружено различий концентрации пероксида водорода в КВВ у мужчин и женщин, при этом вес и рост обследованных лиц также не влиял на его концентрацию. Это согласуется с имеющимися данными, которые показали, что рост, вес, пол и показатели легочной функции не влияют на концентрацию пероксида водорода в КВВ у здоровых субъектов или больных ХОБЛ [12].

Во всех обследованных группах больных с заболеваниями органов дыхания содержание пероксида водорода в КВВ было значительно выше по сравнению со здоровым контролем ($p < 0,05$) (рис. 3).

У больных ХОБЛ концентрация пероксида водорода в КВВ была достоверно повышена по сравнению со здоровыми некурящими и курильщиками ($2,25 \pm 1,10$ мкмоль / л и $1,62 \pm 0,38$ и $1,75 \pm 0,33$ мкмоль / л соответственно; $p < 0,05$). Не обнаружено статистически значимой разницы в содержании пероксида водорода в КВВ у некурящих боль-

ных ХОБЛ по сравнению с курящими пациентами и экс-курильщиками с ХОБЛ ($1,94 \pm 0,66$ мкмоль / л; $2,21 \pm 1,16$ мкмоль / л и $2,17 \pm 1,16$ мкмоль / л соответственно; $p > 0,05$). У пациентов с обострением ХОБЛ концентрация пероксида водорода была достоверно выше, чем при ремиссии заболевания ($2,47 \pm 1,21$ мкмоль / л и $1,94 \pm 0,86$ мкмоль / л; $p = 0,028$).

Табачный дым вызывает миграцию нейтрофилов и других клеток, участвующих в формировании воспалительного процесса, в нижние отделы дыхательных путей. Эти клетки продуцируют пероксид водорода, уровень которого в КВВ курящих людей был в 5 раз выше, чем у некурящих [16]. Это позволило сделать вывод, что курение сигарет увеличивает оксидативный стресс с повышенной продукцией активных форм кислорода, способствуя развитию болезней, связанных с курением табака.

Показано, что уровень пероксида водорода в КВВ больных ХОБЛ является более чувствительным маркером оценки тяжести течения этого заболевания, по сравнению с концентрацией изопростана-8 в КВВ и числом нейтрофилов в индуцированной мокроте (GOLD, 2003). Ранее было продемонстрировано высокое содержание пероксида водорода в КВВ больных ХОБЛ, особенно у больных с обострением заболевания, а также получающих базисное лечение иГКС, по сравнению со здоровым контролем [17].

Интересно, что хотя курение рассматривается как наиболее частый фактор риска развития ХОБЛ, не у всех курящих людей встречается это заболевание. Также не было обнаружено существенных различий уровня пероксида водорода при ХОБЛ между курящими и теми, кто никогда не курил. Не удалось обнаружить корреляции между концентрацией пероксида водорода в КВВ и количеством выкуриваемых сигарет в день [16]. Таким образом, признавая тот факт, что окислительный стресс характерен для ХОБЛ, вряд ли его происхождение всегда обусловлено курением.

У пациентов с БА содержание пероксида водорода в КВВ также было значительно выше по сравнению со здоровыми некурящими и курильщиками ($3,90 \pm 1,52$ мкмоль / л и $1,62 \pm 0,38$ мкмоль / л и $1,75 \pm 0,33$ мкмоль / л соответственно; $p < 0,0001$). У пациентов с обострением БА концентрация пероксида водорода была достоверно выше, чем у больных в стадии ремиссии ($4,49 \pm 1,44$ мкмоль / л и $3,05 \pm 1,21$ мкмоль / л; $p = 0,0016$).

Ранее было показано, что концентрация пероксида водорода в КВВ увеличена как у взрослых больных БА, так и у детей, в том числе со стабильным течением заболевания [18]. С осложнением течения БА содержание пероксида водорода в КВВ увеличивается. Была продемонстрирована прямая связь между концентрацией пероксида водорода в КВВ с числом эозинофилов и концентрацией эозинофильного катионного протеина в индуцированной мокроте у больных БА, ранее не получавших лечение ГКС [19].

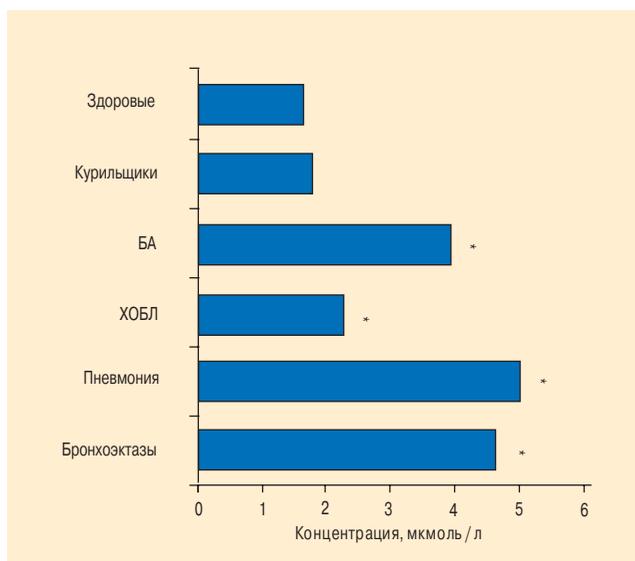


Рис. 3. Концентрация пероксида водорода в КВВ у здоровых людей и больных с различными заболеваниями легких
* — $p < 0,0001$ по сравнению со здоровыми людьми

Наибольшая концентрация пероксида водорода в КВВ обнаружена у больных пневмонией ($5,01 \pm 2,15$ мкмоль / л; $p < 0,0001$ по сравнению со здоровым контролем). Ранее, повышение концентрации пероксида водорода в КВВ описано у пациентов с пневмонией и респираторным дистресс-синдромом, находящихся на ИВЛ. У больных с госпитальной пневмонией наблюдалось повышение концентрации пероксида водорода в КВВ в 3–5 раз, чем у здорового контроля, и обнаружено уменьшение его уровня в процессе лечения. Это позволило сделать вывод, что пневмония сопровождается оксидативным стрессом в дыхательных путях и определение пероксида водорода в КВВ можно использовать для неинвазивного мониторинга уровня оксидантов при лечении инфекции нижних дыхательных путей [20].

Высокая концентрация пероксида водорода в КВВ обнаружена также у пациентов с бронхоэктазами ($4,63 \pm 1,74$ мкмоль / л; $p < 0,0001$ по сравнению со здоровыми контролем). Ранее были продемонстрированы увеличенный уровень пероксида водорода в КВВ и его связь с тяжестью течения заболевания у больных с бронхоэктазами. Была выявлена обратная корреляция между концентрацией пероксида водорода в КВВ и ФВД [21].

Мы не обнаружили корреляций между концентрацией пероксида водорода в КВВ и другими показателями КВВ (уровнем pH, содержанием электролитов и объемом), а также с легочной функцией при различных заболеваниях органов дыхания.

Таким образом, использованный нами высокоселективный сенсорный метод с использованием берлинской лазури позволяет определять пероксид водорода в более низких концентрациях, чем существующие электрохимические методы с использованием электродов из платины и фермента пероксидазы. Уровень пероксида водорода в КВВ отражает степень активности воспалительных клеток с увеличением его продукции при пневмонии, бронхоэктазах, БА и ХОБЛ и может быть использован для оценки активности воспаления в дыхательных путях и эффективности противовоспалительного лечения.

При исследовании КВВ здоровых добровольцев обнаружилась протеолитическая активность. В среднем активность эластазы составила $2,66 \times 10^{-11}$ М $\pm 1,14 \times 10^{-11}$ М, протеиназы 3 — $1,49 \times 10^{-11}$ М $\pm 0,51 \times 10^{-11}$ М, катепсина G — $8,54 \times 10^{-11}$ М $\pm 7,07 \times 10^{-11}$ М, что свидетельствует о том, что на поверхности дыхательных путей в норме содержатся нейтрофильные протеиназы, которые защищают дыхательный эпителий от патогенных микроорганизмов и других повреждающих факторов окружающей среды.

При анализе КВВ курильщиков с ИКЧ менее 3,5 пачко-лет была обнаружена высокая активность всех трех исследуемых ферментов: средняя активность эластазы составляла $7,48 \times 10^{-11}$ М $\pm 1,94 \times 10^{-11}$ М, протеиназы 3 — $21,30 \times 10^{-11}$ М $\pm 6,40 \times 10^{-11}$ М, катепсина G — $26,50 \times 10^{-11}$ М $\pm 6,56 \times 10^{-11}$ М, что существенно выше, чем у здоровых субъектов (рис. 4).

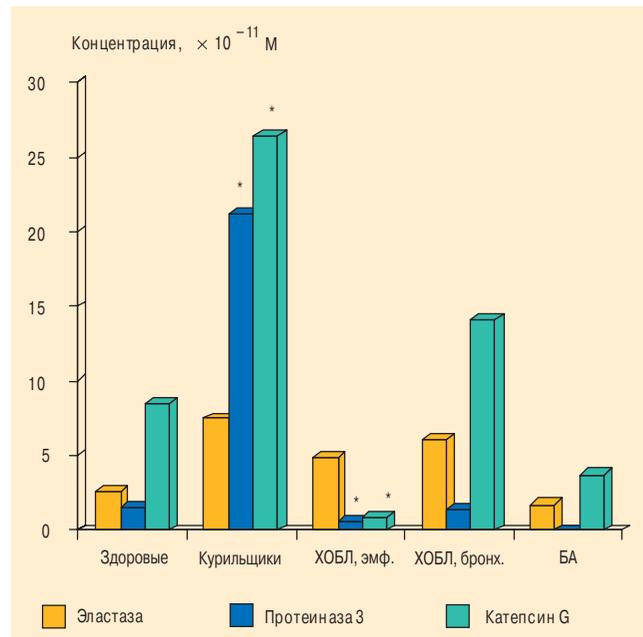


Рис. 4. Активность протеиназ в КВВ здоровых людей, курильщиков, больных БА и с различными типами ХОБЛ
* — $p < 0,0001$ по сравнению со здоровыми людьми

Ранее было показано, что суммарная концентрация протеинов и хемотаксическая активность нейтрофилов в КВВ молодых курильщиков существенно увеличена по сравнению со здоровыми некурящими людьми [22]. Следовательно, определение маркеров нейтрофилов в КВВ может помочь в ранней диагностике воспаления в дыхательных путях, вызванного табакокурением, и в выявлении субъектов с повышенным риском развития ХОБЛ.

Таким образом, было показано, что у курильщиков с небольшим стажем курения протеолитическая активность в КВВ увеличивается по сравнению с некурящими здоровыми субъектами. Увеличенная концентрация протеиназы в КВВ молодых курильщиков может объясняться существенным привлечением нейтрофилов в дыхательные пути, что является наглядным доказательством вреда, наносимого табакокурением.

Анализ образцов КВВ, собранных у пациентов с различными вариантами ХОБЛ показал, что активность протеиназы в КВВ при бронхитическом типе была выше, чем у больных с эмфизематозным типом ХОБЛ.

Как видно на рис. 4, активность эластазы у пациентов с различными типами ХОБЛ существенно не различается, а активность протеиназы 3 и катепсина G при бронхитическом типе значительно выше. Активность эластазы при обоих типах ХОБЛ в среднем была выше, чем у здоровых людей, но ниже, чем у курильщиков. Однако различия носили недостоверный характер. Активность протеиназы 3 при эмфизематозном типе ХОБЛ была значительно ниже, чем у здоровых, и еще ниже, чем у курильщиков. Активность протеиназы 3 при бронхитическом типе существенно ниже по сравнению с курильщиками. Ак-

тивность катепсина G у больных с бронхитическим типом ХОБЛ выше, чем у здоровых людей и ниже, чем у курильщиков.

Таким образом, в КВВ у пациентов с обострением ХОБЛ обнаруживается активность всех трех исследуемых протеиназ. При бронхитическом типе ХОБЛ активность протеиназы 3 в среднем в 3 раза, а катепсина G — в 18 раз выше, чем при эмфизематозном типе.

В недавно опубликованной работе по исследованию маркеров воспаления при двух разных фенотипических вариантах ХОБЛ было показано, что у пациентов с бронхитическим типом ХОБЛ содержание IL-8 и 8-изопростана в КВВ значительно выше по сравнению с эмфизематозным типом. У курильщиков также обнаружено высокое содержание этих маркеров в КВВ при сравнении с эмфизематозным типом ХОБЛ [23].

Таким образом, сопоставление различных нейтрофильных маркеров воспаления в КВВ, в том числе повышение активности протеиназ в КВВ при бронхитическом варианте ХОБЛ, позволяет предполагать невоспалительный характер патогенеза эмфизематозного типа ХОБЛ. Эти данные могут указывать на определяющую роль нейтрофилов в развитии и прогрессировании этого варианта болезни. Если рассматривать ХОБЛ в целом, не дифференцируя ее на различные типы, то наблюдается промежуточная картина между здоровыми субъектами и курильщиками. Это может объясняться тем, что организм со временем адаптируется к веществам, содержащимся в табачном дыме.

Активность нейтрофильной эластазы в КВВ у больных БА в среднем была на 35 %, а катепсина G — на 56 % ниже, чем у здоровых людей. Минимальная активность эластазы и катепсина G в КВВ при БА может быть следствием того, что при этом заболевании, в частности при обострении, происходит привлечение в легкие из кровотока большого числа эозинофилов и тучных клеток, имеющих иной набор ферментов и цитокинов.

При типичной внебольничной неосложненной пневмонии протеолитическая активность в КВВ не обнаруживается. Незначительная ферментативная активность была обнаружена у лихорадящей больной и у пациента с абсцедирующей пневмонией.

У больных ИЛФ средняя концентрация эластазы составила около 25 % эластазной активности здорового контроля, а активность катепсина G и протеиназы 3 не обнаруживалась. Это может быть связано с выраженными нарушениями легочной функции и с поражением терминального отдела респираторного тракта при ИЛФ, что также может влиять на состав КВВ.

Лишь у одного из пяти обследованных пациентов с бронхоэктазами обнаружилась активность всех трех исследуемых протеиназ. Возможно, локальное воспаление не вносит значительный вклад в состав КВВ. Несмотря на это, факт отсутствия протеиназ в КВВ больных с бронхоэктазами требует дальнейших исследований.

Известно, что у пациентов с муковисцидозом наблюдается существенное увеличение активности эластазы в легких, о чем свидетельствуют имеющиеся данные по анализу мокроты этих больных [24]. В отдельных экспериментах было показано, что в мокроте больных муковисцидозом содержатся все три исследуемых нами фермента в значительных количествах. Исходя из этого, можно предположить, что активности эластазы, протеиназы 3 и катепсина G в КВВ больных муковисцидозом должны быть наибольшие. Однако такое утверждение может быть справедливым, если существует прямая корреляция между содержанием веществ в бронхиальном секрете и в КВВ. Как показали результаты проведенного нами исследования, такая корреляция при муковисцидозе отсутствует, так как в КВВ эти протеиназы присутствуют в следовых количествах. Только у одного из шести обследованных больных муковисцидозом в КВВ была обнаружена минимальная активность эластазы. Возможно, это связано с тем, что бронхиальный секрет у больных муковисцидозом очень густой и протеиназы не могут попадать в выдыхаемый воздух.

Методом линейного корреляционного анализа была выявлена связь между активностью нейтрофильной эластазы и катепсина G в КВВ у больных БА ($r = 0,70$; $p = 0,04$) и тенденция к существованию связи между содержанием эластазы и катепсина G в КВВ у больных ХОБЛ ($r = 0,44$; $p = 0,09$). Это указывает на то, что определения одного фермента для оценки протеолитической активности КВВ при патологии легких недостаточно.

Полученные результаты показали возможность определения активности трех исследуемых протеиназ в КВВ здоровых людей и большинства пациентов с патологией легких. Суммарные результаты по измерению активности эластазы, протеиназы 3 и катепсина G в КВВ в норме и при различных заболеваниях органов дыхания наглядно иллюстрируют определенные различия в активностях исследованных протеиназ в КВВ у здоровых субъектов, курильщиков и пациентов с различными заболеваниями легких.

Выводы

1. Комплексное исследование КВВ — неинвазивный метод, позволяющий оценить морфо-функциональное состояние респираторной системы при воспалительных заболеваниях органов дыхания.
2. Уровень pH КВВ у курильщиков и больных с различными заболеваниями легких ниже, чем у здоровых людей, и коррелирует с клиническим течением пневмонии, ИЛФ и БА. При внебольничной пневмонии и обострении БА pH КВВ имеет существенно низкие значения, при лечении его уровень достоверно увеличивается, что указывает на уменьшение активности воспаления в дыхательных путях.

3. Электролитный дисбаланс в виде повышенного выделения легкими натрия и калия и пониженного выделения кальция в КВВ отражает нарушение функции эпителия, участвующего в продукции секрета. Отсутствие достоверных различий в концентрациях электролитов в КВВ у больных муковисцидозом является следствием блокирования эпителия бронхов большим объемом вязкой мокроты в дыхательных путях.
4. Концентрация пероксида водорода в КВВ, определяемого высокочувствительным сенсорным методом, достоверно повышена у больных БА, ХОБЛ, пневмонией и бронхоэктазами по сравнению со здоровыми некурящими и курильщиками, что указывает на высокую степень активности воспаления в дыхательных путях.
5. Высокая активность нейтрофильной эластазы, протеиназы 3 и катепсина G в КВВ у курильщиков и пациентов с бронхитическим типом ХОБЛ свидетельствует о выраженности местного воспаления в бронхиальном дереве.
10. *Carpagnano G.E., Barnes P.J., Francis J. et al.* Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: a new noninvasive marker of airway inflammation? *Chest* 2004; 125 (6): 2005–2010.
11. *Гельцер Б.И., Кривенко Л.Е., Невзорова В.А., Лукьянов П.А.* Респираторное влаговыведение и значение его исследования в пульмонологии. *Тер. арх.* 2000; 72 (3): 46–50.
12. *Gessner C., Kuhn H., Seyfarth H.J. et al.* Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie.* 2001; 55 (9): 414–419.
13. *Хасуна М.Ю.* Минеральный обмен легких в условиях нормы и острого воспаления: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток; 2004.
14. *Fukuda N., Jayr C., Lazrak A. et al.* Mechanisms of TNF-alpha stimulation of amiloride-sensitive sodium transport across alveolar epithelium. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2001; 280 (6): L1258–L1265.
15. *Griese M., Noss J., Schramel P.* Elemental and ion composition of exhaled air condensate in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2003; 2 (3): 136–142.
16. *Nowak D., Kalucka S., Bialasiewicz P., Krol M.* Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by healthy subjects. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 30 (2): 178–186.
17. *Kostikas K., Papatheodorou G., Psathakis K. et al.* Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. *Chest.* 2003; 124 (4): 1373–1380.
18. *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.
19. *Loukides S., Bouros D., Papatheodorou G. et al.* The relationships among hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation, and asthma severity. *Chest* 2002; 121 (2): 338–346.
20. *Majewska E., Kasielski M., Luczynski R. et al.* Elevated exhalation of hydrogen peroxide and thiobarbituric acid reactive substances in patients with community acquired pneumonia. *Respir. Med.* 2004; 98 (7): 669–676.
21. *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.
22. *Garey K.W., Neuhauser M.M., Robbins R.A. et al.* Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest* 2004; 125 (1): 22–26.
23. *Almonacid C., Izquierdo J.L., Perez J. et al.* Inflammatory markers in exhaled breath condensate of two COPD phenotypes. *Eur. Respir. J.* 2005; 26 (suppl. 49): A1767.
24. *Sagel S.D., Kapsner R., Osberg I. et al.* Airway inflammation in children with cystic fibrosis and healthy children assessed by sputum induction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164 (8 pt 1): 1425–1431.

Литература

1. *Kharitonov S.A., Barnes P.J.* Exhaled markers of pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163: 1693–1722.
2. *Aniczak A., Kharitonov S.A., Montuschi P. et al.* Inflammatory response to sputum induction measured by exhaled markers. *Respiration* 2005; 72 (6): 594–599.
3. *Орлов С.Н., Баранова И.А., Чучалин А.Г.* Внутриклеточные механизмы сигнализации и патологии легких. Транспорт ионов в клетках эпителия дыхательных путей. *Пульмонология.* 1999; 1: 77–84.
4. *Korkmaz B., Attucci S., Moreau T. et al.* Design and use of highly specific substrates of neutrophil elastase and proteinase 3. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2004; 30: 801–807.
5. *Rosias P.P., Dompeling E., Hendriks H.J. et al.* Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2004; 15 (1): 4–19.
6. *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.
7. *Ojoo J.C., Mulrennan S.A., Kastelik J.A. et al.* Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis. *Thor* 2005; 60 (1): 22–26.
8. *Niimi A., Nguyen L.T., Usmani O. et al.* Reduced pH and chloride levels in exhaled breath condensate of patients with chronic cough. *Thorax* 2004; 59 (7): 608–612.
9. *Torrego A., Cimbollek S., Hew M., Chung K.F.* No effect of omeprazole on pH of exhaled breath condensate in cough associated with gastro-oesophageal reflux. *Cough* 2005; 10 (1): 1–4.