

Клинические исследования портативного электрохимического анализатора монооксида азота (NO) в выдыхаемом воздухе

ФГУ "НИИ пульмонологии ФМБА России": 105077, Москва, ул. 11-я Парковая, 32, к. 4

Han Do O, G.L.Osipova, E.V.Babarskov

Clinical testing of a portable electrochemical analyzer of nitric oxide (NO) in the exhaled air

Summary

The aim of this study was to assess clinical utility of a portable electrochemical NO analyzer NObreath (Bedfont Scientific, Ltd) in screening and monitoring of efficacy of drug therapy of bronchial asthma patients. NO concentration in the exhaled air (NOex) was measured in healthy volunteers and asthmatics. We found that the mean morning and evening NOex in healthy volunteers for 4 week period were 16.2 and 17.4 ppb, respectively. In patients with newly diagnosed mild asthma, the NOex correlated with lung function. In moderate persistent asthma patients, the obtained data correlated with PEF and results of the ACT test which allowed adjusting doses of ICS (fluticasone dipropionate). Three-month therapy and monitoring allowed 35 % reduction in the maintenance dose of ICS. In hospitalized patients with exacerbation of moderate persistent asthma treated with budesonide, NOex decreased approximately by 40 % to the 7th day of the therapy. This suggests NOex is to be more sensitive marker of airway inflammation compared to lung function. In conclusion, NObreath allows selective and reproducible measuring NO concentration in the exhaled air and could be used both for early detection of asthma and monitoring treatment effects.

Key words: nitric oxide, analyzer, bronchial asthma, inflammation.

Резюме

Целью исследования было изучение возможности применения прибора *NObreath (Bedfont Scientific Ltd)*, для определения концентрации монооксида азота (NO) в выдыхаемом воздухе человека в норме и при бронхиальной астме (БА), а так же в процессе проводимой антиастматической терапии. В исследовании принимали участие 60 человек, которые были разделены на 4 группы: 1 состояла из здоровых добровольцев, а 3 другие составляли больные атопической бронхиальной астмой (АБА), легкой и средней степени тяжести. Установлено, что средние значения содержания NO в выдыхаемом воздухе здоровых добровольцев, измеряемые 3-кратно утром и вечером в течение 4 нед., достоверно не отличаются и составляют 16,2 и 17,4 ppb. В группе амбулаторных больных с впервые установленным диагнозом АБА легкой степени обнаружена корреляция показаний прибора с параметрами функции внешнего дыхания (ФВД). В группе амбулаторных больных с диагнозом персистирующая АБА средней степени тяжести отмечена корреляция показаний прибора с параметрами пиковой скорости выдоха и результатами теста по контролю над астмой исходно и в процессе лечения, что позволило индивидуально титровать назначаемые дозы ингаляционных глюкокортикостероидов – иГКС (флутиказона дипропионат). В результате лечения и мониторинга изучаемых показателей средняя поддерживающая доза иГКС через 3 мес. лечения у больных данной группы была снижена в среднем на 35 %. В группе госпитализированных больных с обострением персистирующей АБА средней степени тяжести отмечено, что на фоне проводимой противовоспалительной терапии иГКС (будесонид) содержание NO в выдыхаемом воздухе снижалось на 7-е сут. лечения приблизительно на 40 %. То есть, NO как биологический маркер воспалительного процесса дыхательных путей более динамичен по сравнению с показателями ФВД. Таким образом, прибор *NObreath* продемонстрировал хорошую воспроизводимость результатов измерения NO и может быть использован как для раннего выявления больных АБА, так и для мониторинга эффективности применяемых схем лечения.

Ключевые слова: оксид азота, анализатор, бронхиальная астма, воспаление.

В последнее 10-летие во всем мире возрос интерес ученых к исследованию маркеров воспаления при бронхиальной астме (БА). Основными требованиями к методам, определяющим возможность исследования маркеров воспаления, являются простота и нетравматичность вмешательства, возможность использования приборов в амбулаторных условиях, возможность регулярного мониторинга эффективности проводимой терапии, применения для диагностики БА.

Оксид азота (II) – NO – был открыт в 1774 г. англичанином *Джозефером Пристли* (1733–1804) [1].

Молекула NO содержит 1 неспаренный электрон, поэтому обладает парамагнитными свойствами

и может быть зарегистрирована по сигналу электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Впервые в нашей стране сигнал ЭПР, обусловленный присутствием NO в биологических системах, был открыт в 1963 г. *А.Ф.Ваниным* и *Р.М.Налбандяном* [2]. Работая в то время в лаборатории *Л.А.Блюменфельда* в Институте химической физики АН СССР, они обнаружили новый сигнал ЭПР в пекарских дрожжах. Позже были обнаружены парамагнитные центры, дающие такой же сигнал ЭПР, в тканях животных. Сегодня известно, что NO – свободный радикал, производимый клетками, практически всех органов и тканей человека, среднее время жизни которого в организме составляет около 5 с. NO образуется из

аминокислоты L-аргинин под действием фермента, индуцибельной NO-синтазы, и является важнейшим информоном, т. е. веществом-посредником, выделяющимся из нервных окончаний на поверхность тех клеток, которым предназначен сигнал. В физиологических концентрациях NO расширяет сосуды, снижает давление крови, препятствует тромбообразованию, повышает активность макрофагов. Журнал *Science* в 1992 г. назвал NO молекулой года. Показано, что NO выделяется в дыхательных путях эпителиальными клетками и обнаруживается в выдыхаемом воздухе [3, 4]. Его концентрация особенно значительно повышается в случае возникновения эозинофильного воспаления дыхательных путей, характерного для бронхиальной астмы (БА) [5–7]. В свою очередь, установленная закономерность вызывает растущий интерес в связи с возможностью неинвазивного исследования аллергического воспаления при БА [5, 6, 8–10].

Уровень NO в выдыхаемом воздухе все чаще используется для оценки эффективности лечения БА, т. к. показана его связь с наличием воспаления [11]. Перспективно также применение рассматриваемого метода для проведения дифференциальной диагностики заболеваний легких. По данным ряда исследований, содержание NO в выдыхаемом воздухе у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) не повышено, в отличие от больных БА [12, 13].

Классическим "золотым стандартом" измерения NO в выдыхаемом воздухе является хемилюминесцентный метод, основанный на реакции NO с озонном (O_3) [14]. Однако хемилюминесцентные анализаторы дороги и требуют специально оборудованного помещения. В связи с этим за последнее 10-летие все более широкое применение в клинической практике находят портативные электрохимические анализаторы NO, одним из которых, и пока единственным зарегистрированным в России, является прибор *NObreath* (*Bedfont Scientific Ltd*, Великобритания). Известным недостатком, присущим электрохимическим анализаторам, является сравнительно невысокая селективность и чувствительность измерений, т. е. зависимость показаний прибора от наличия в воздухе посторонних примесей. Поэтому прибор *NObreath*, наряду с 2 другими коммерчески выпускаемыми электрохимическими анализаторами, прошел сравнительные испытания с "золотым стандартом" — хемилюминесцентным анализатором LRL2000 в компании *Logan Research Ltd* (Великобритания). В результате были сделаны следующие выводы:

1. Показания прибора *NObreath* оказались наиболее близкими к показаниям прибора LRL2000.
2. Лучшее соотношение "сигнал—шум", благодаря использованию усовершенствованного сенсора, и наименьший предел обнаружения (1 ppb).
3. Оригинальная комбинация бактериального фильтра и молекулярного сита в сменном мундштуке позволяет существенно уменьшить перекрестную реакцию прибора на водяные пары и углекислый газ, содержащиеся в выдыхаемом воздухе.

Целью наших исследований было изучение возможности применения прибора *NObreath*, для определения концентрации NO в выдыхаемом воздухе человека в норме и при БА, а так же в процессе проводимой противоастматической терапии.

Материалы и методы

Исследования проводились в 4 этапа. На 1-м этапе исследования изучалось содержание NO в выдыхаемом воздухе у здоровых добровольцев, не курящих, не употребляющих кофе, кофеин, нитраты и не имеющих заболеваний верхних и нижних дыхательных путей. Содержание NO измерялось 3 раза подряд утром и вечером, ежедневно в течение 4 нед. В исследование были включены 10 добровольцев (2 мужчин и 8 женщин), средний возраст — $31,6 \pm 12,2$ года. Всем добровольцам были проведены кожные аллергологические пробы (*prick test*) со стандартным набором аллергенов. Результаты проб были отрицательными. Собран анамнез и проведен клинический осмотр.

На 2-м этапе изучалась возможность подтверждения предполагаемого диагноза БА у некурящих пациентов, впервые обратившихся за медицинской помощью. Измерение NO у каждого пациента проводилось во время 1-го визита 3 раза подряд, и рассчитывалось ближайшее целое среднее значение. Измерялись параметры функции внешнего дыхания (объем форсированного выдоха за 1-ю с — ОФВ₁) и проводился бронходилатационный тест с ингаляцией Вентолина, 200 мкг / доза, согласно рекомендациям GINA 2006 г. Всем больным также проводилось кожное тестирование с причинно-значимыми аллергенами, измерялись показатели насыщения крови кислородом (SpO₂) пульсоксиметром, изучался анамнез, проводился клинический осмотр. В результате проведенного обследования диагноз АБА подтвердился у 20 пациентов (14 мужчин и 6 женщин), средний возраст — $32,3 \pm 12,3$ лет.

Третий этап исследований включал в себя изучение возможности корректировки дозы ингаляционных глюкокортикостероидов (иГКС) у амбулаторных больных АБА. Коррекция доз проводилась с учетом параметров пикфлоуметрии (пиковой скорости выдоха — ПСВ), результатов АСТ-теста и содержания NO в выдыхаемом воздухе. Лечение проводилось в течение 3 мес. с ежемесячными визитами для контроля вышеперечисленных параметров. Измерение NO производилось во время каждого визита, по 3 раза у каждого пациента, и рассчитывалось среднее значение, округленное до ближайшего целого. В исследовании были включены 20 пациентов с подтвержденным диагнозом персистирующей АБА средней степени тяжести (4 мужчин и 16 женщин), средний возраст — $35,4 \pm 14,5$ лет. Исходно все больные принимали иГКС, в пересчете на флутиказона дипропионат, в дозе 500 мкг в сутки и β_2 -агонист сальбутамол по потребности.

На 4-м этапе проводилось сравнительное исследование содержания NO в выдыхаемом воздухе и значений объема форсированного выдоха за 1-ю с

(ОФВ₁) у госпитализированных больных с персистирующей АБА средней степени тяжести в период обострения на фоне проводимой противовоспалительной терапии иГКС (будесонидом – в дозе 1 600 мкг в сут.) и небулайзерной терапии раствором бронхолитика (Беродуал – в дозе 2–4 мл в сут.). Измерения производились 1 раз в сут. у каждого пациента в течение первых 7 сут. лечения. В исследование были включены 10 пациентов (3 мужчины и 7 женщин), средний возраст – $37,6 \pm 10,2$ года.

Критериями исключения во всех группах являлись острые респираторные заболевания и табакокурение. Больным не рекомендовалось принимать кофе, кофеин, нитраты. Контроль табакокурения производился при помощи приборов *Smokerlyzer* (*Bedfont Scientific Ltd*, Великобритания), предназначенных для измерения содержания монооксида углерода (СО) в выдыхаемом воздухе. Исследования проводились при нормальной комнатной температуре воздуха (20 ± 5 °С).

Результаты и обсуждение

Как следует из данных табл. 1, средние по группе значения уровня NO в выдыхаемом воздухе здоровых добровольцев, измеряемые утром и вечером в течение 4 нед., составляют 16,2 и 17,4 ppb соответственно. Принимая во внимание индивидуальный разброс данных, можно заключить, что различие значений недостоверно, хотя это можно трактовать

Таблица 1
Средние значения и вариации уровня NO в выдыхаемом воздухе у здоровых добровольцев в течение 4-недельного исследования

№* пациента	Показания прибора, ppb	
	утро	вечер
1	15,3 ± 3,8	11,6 ± 2,2
2	17,2 ± 2,5	12,4 ± 2,4
3	19,2 ± 2,8	12,7 ± 2,3
4	22,1 ± 3,5	11,8 ± 2,5
5	24,1 ± 2,1	16,0 ± 3,6
6	25,0 ± 1,7	18,1 ± 3,3
7	13,8 ± 4,6	10,5 ± 1,9
8	14,5 ± 4,2	11,9 ± 2,2
9	17,4 ± 3,1	21,2 ± 2,6
10	16,9 ± 2,7	24,0 ± 3,1

Примечание: * – номер волонтера-добровольца.

и как результат активной экспозиции дыхательных путей в среде раздражителей и аллергенов в дневное время суток. Уровень СО в выдыхаемом воздухе у здоровых добровольцев не превышал 4 ppb, что свидетельствует об отсутствии табакокурительщиков в исследуемой группе.

Данные, представленные в табл. 2, указывают на корреляцию показаний прибора *NObreath* с величиной ОФВ₁ и увеличением ее обратимости после ин-

Таблица 2
Средние значения уровня NO в выдыхаемом воздухе, величина ОФВ₁ и коэффициент обратимости после ингаляции бронхолитика, насыщение крови кислородом (SpO₂), наибольшая величина диаметра волдыря кожных аллергопроб (*prick test*) у пациентов со впервые установленным диагнозом АБА

№ пациента	Уровень NO в выдыхаемом воздухе, ppb	Коэффициент обратимости ОФВ ₁ , %дожк.	ОФВ ₁ , %	SpO ₂ , %	Prick test
1	36	83	21	98	3+
2	21	90	13	97	3+
3	38	85	20	96	3+
4	41	79	15	98	4+
5	29	92	12	97	2+
6	30	89	15	98	3+
7	35	81	16	98	3+
8	44	80	25	98	4+
9	32	85	14	96	3+
10	30	88	12	98	3+
11	29	92	13	96	3+
12	39	77	28	96	3+
13	40	80	22	97	3+
14	34	90	15	98	3+
15	33	87	17	98	3+
16	20	89	12	96	2+
17	31	85	14	96	3+
18	25	91	16	98	3+
19	37	81	21	96	3+
20	28	85	12	96	3+

галяции бронхолитика у большинства пациентов (85 %) с подтвержденным диагнозом БА. Исключением составляют пациенты № 2, 16, 18.

Приводим клинический пример.

Больной Т. 46 лет впервые обратился с жалобами на приступы удушья. Ранее больной обследовался, но тест на обратимость обструкции с бронхолитиком сальбутамолом был отрицательным. В результате проведенного нами обследования у больного были выявлены положительные кожные пробы к эпидермису собаки 4+, а содержание NO в выдыхаемом воздухе составило 44 ppb. Повторное проведение теста на обратимость с сальбутамоломом дало прирост показателя ОФВ₁ на 25 %. Больному впервые был поставлен диагноз АБА и даны рекомендации по исключению контакта с аллергеном.

Уровень СО в выдыхаемом воздухе у пациентов этой группы был несколько выше, чем у здоровых добровольцев, но не превышали 6 ppm, что ниже пороговой величины для табакокурльщиков. Некоторое увеличение содержания СО, может объясняться увеличением скорости реакции катаболизма гемм-содержащих соединений, происходящей в присутствии фермента гемоксигеназы-1, продуцируемой клетками бронхиального эпителия и сосудистого эндотелия в результате возникновения хронического воспалительного процесса.

Табл. 3 наглядно иллюстрирует возможности прибора *NObreath* для мониторинга эффективности поддерживающей терапии и корректировки назначаемой дозы иГКС амбулаторным больным персистирующей БА средней степени тяжести. Показания прибора коррелируют с показаниями пикфлоуметра, особенно с вариабельностью ПСВ в процессе лечения, которая косвенно отражает гиперреактивность бронхов, т. е. интенсивность протекания хронического воспалительного процесса. Полученные данные, наряду с результатами АСТ-теста, позволили более чем у половины пациентов этой группы на 4-м

визите снизить назначаемые дозы вдвое, т. е. до 250 мкг в сутки. В целом же по группе средняя поддерживающая доза препарата была снижена на 35 %.

В табл. 4 приведены значения содержания NO в выдыхаемом воздухе и параметра ОФВ₁ у исследуемой группы госпитализированных больных с персистирующей АБА средней степени тяжести в фазе обострения. Показания прибора *NObreath* на 7-е сут. снижаются примерно на 40 %, более динамично отражая результаты противовоспалительной терапии, чем показатель ОФВ₁. Это позволяет более гибко регулировать назначаемую дозу и длительность терапии, а в результате — минимизировать побочные эффекты, характерные для ингаляционных и системных ГКС, а также снизить общую стоимость необходимых лекарственных препаратов.

Заключение

Портативный электрохимический анализатор NO, прибор *NObreath* (*Bedfont Scientific Ltd*, Великобритания), позволяет:

- 1) осуществлять специфичные и воспроизводимые измерения эндогенного NO в выдыхаемом воздухе;
- 2) проводить скрининговые исследования по раннему выявлению больных БА;
- 3) мониторировать эффективность применяемых схем лечения БА, гибко корректировать назначаемые дозы лекарственных препаратов и длительность проведения терапии как амбулаторных, так и госпитализированных больных.

Данные исследования были частично проведены в рамках НИР по Государственному контракту № 16.740.11.0010 Федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг."

Литература

1. Зеленин К.Н. Оксид азота (II): новые возможности давно известной молекулы. Соросов. образоват. журн. 1997; 10: 105–110.
2. Ванин А.Ф., Налбандян Р.М. Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках. Биофизика 1966; 10: 167.
3. Gustafsson L., Leone A., Persson M. et al. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea-pigs and humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 181: 852–857.
4. Leone A., Gustafsson L., Francis P. et al. Nitric oxide is present in exhaled breath in humans: direct GC-MS confirmation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 201: 883–887.
5. Alving K., Weitzberg E., Lundberg J. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur. Respir. J.* 1993; 6: 1368–1370.

Таблица 3
Коррекция поддерживающей монотерапии иГКС в группе амбулаторных больных с персистирующей АБА средней степени тяжести в течение 3 мес. наблюдения

Визит	1-й	2-й	3-й	4-й
Средняя суточная доза препарата, мкг	500	500	375	325
Показания прибора				
<i>NObreath</i> , ppb	56	34	28	26
ПСВ, %	65	80	87	91
Вариабельность				
ПСВ, %	37	27	15	11
АСТ-тест, баллы	17	22	23	25

Таблица 4
Мониторинг среднего содержания NO в выдыхаемом воздухе и ОФВ₁ в группе госпитализированных больных персистирующей БА средней степени тяжести в период обострения на фоне лечения

Время от начала терапии, сутки	0	1	2	3	4	5	6	7
Показания прибора, ppb	58	54	48	43	40	38	36	35
ОФВ ₁ , %	57	60	62	64	66	69	72	75

6. Kharitonov S., Yates D., Robbins R. et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133–135.
7. Persson M., Zetterstrom O., Agrenius V. et al. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994; 343: 146–147.
8. Barnes P., Kharitonov S. Exhaled nitric oxide: a new lung function test. *Thorax* 1996; 51: 233–237.
9. Kharitonov S., Barnes P. Exhaled nitric oxide: a marker of airway inflammation? *Curr. Opin. Anaesthesiol.* 1996; 9: 542–548.
10. Lundberg J.O.N., Weitzberg E., Lundberg J.M., Alving K. Nitric oxide in exhaled air. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 2671–2680.
11. Smith A., Taylor D. Is exhaled nitric oxide measurement a useful clinical test in asthma? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 5 (1): 49–56.
12. Robbins R., Floreani A., Von Essen S. et al. Measurement of exhaled nitric oxide by three different techniques. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 1631–1635.
13. Rutgers S., Postma D., van der Mark T., Koeter G. Nitric oxide in exhaled air in COPD. *Eur. Respir. J.* 1996; 9 (Suppl. 23): 13s.
14. Kharitonov S., Alving K., Barnes P. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendation. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 1683–1693.

Информация об авторах

О Хан До – к. м. н., зав. отделом биоэнергетики ФГУ "НИИ пульмонологии ФМБА России"; тел.: 8 (916) 407-10-99

Осипова Галина Леонидовна, д. м. н., ведущий научный сотрудник ФГУ "НИИ пульмонологии ФМБА России"; тел.: (495) 466-93-63; e-mail: himic@nm.ru

Бабарсков Евгений Викторович – к. т. н., ведущий научный сотрудник лаборатории функциональных и ультразвуковых методов исследования ФГУ "НИИ пульмонологии ФМБА России"; тел.: (495) 396-53-09, (495) 465-52-64; e-mail: babarskov@mail.ru

Поступила 10.09.11
© Коллектив авторов, 2010
УДК 616.24-008.7-074