

**Dariusz Ziara<sup>1</sup>, Anna Polońska<sup>1</sup>, Katarzyna Kałuska<sup>3</sup>,  
Piotr Rozentryt<sup>2</sup>, Przemysław Trzeciak<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> z Kliniki Ftizjopneumonologii ŚAM w Zabrze Kierownik : prof. dr hab. med. K. Oklek  
z III Kliniki Kardiologii Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrze<sup>2</sup>  
kierownik: prof. dr hab. med. L. Poloński  
z Poradni Chorób Płuc i Gruźlicy Tychy<sup>3</sup> kierownik: dr A. Kisala

## STĘŻENIE TLENKU AZOTU W POWIETRZU WYDECHOWYM (eNO) U CHORYCH NA SARKOIDOZĘ – BADANIA WSTĘPNE

CONCENTRATION OF NITRIC OXIDE IN EXHALED AIR IN PATIENTS WITH SARCOIDOSIS  
– PILOT STUDY

**Summary:** Exhaled nitric oxide (eNO) concentration measurement may allow for noninvasive estimation of severity of airways inflammation in asthma and other airways diseases. The purpose of this study was to evaluate usefulness of eNO concentration measurements in patients with pulmonary sarcoidosis. Study group consisted of 22 patients with sarcoidosis (8 women, 14 men aged 26-46). They included 11 patients with radiographically stage I and II and 11 patients with stage III of disease. Sixteen patients had active pulmonary sarcoidosis and 6 had nonactive disease. Ten patients had indications for treatment, 12 patients had not any. Exhaled NO was measured by means of SIEVERS 280 Nitric Oxide Analyser (USA).

There was no significant difference in mean eNO concentration in study group ( $6,91 \pm 0,60$  ppb) and in normal control ( $5,2 \pm 0,73$  ppb,  $p=0,10$ ). Exhaled NO concentration was similar in patients with sarcoidosis stage I and II ( $7,5 \pm 1,08$  ppb) and in patients with stage III disease ( $6,2 \pm 0,51$  ppb,  $p=0,27$ ). We failed to found significant difference in eNO concentration between patients with active ( $6,7 \pm 0,71$  ppb) and nonactive sarcoidosis ( $7,5 \pm 1,1$  ppb;  $p=0,57$ ). Neither did eNO concentration differ between patients with and without indications for therapy ( $5,77 \pm 0,50$  ppb vs.  $7,8 \pm 0,95$  ppb;  $p=0,08$ ). In conclusion our pilot study results indicate that measurement of eNO concentrations may be of little value in patients with sarcoidosis.

**Key words:** sarcoidosis, nitric oxide

PNEUMONOL. ALERGOL. POL., 2002, 70, 5-6, 290-295

**Wstęp** Od 1977 r., gdy tlenek azotu (NO) został zidentyfikowany jako substancja czynna biologicznie, prowadzonych jest szereg badań mających na celu poznanie znaczenia NO w funkcjonowaniu narządów i w procesach patologicznych (5, 14, 16, 19, 25). Tlenek azotu jest wytwarzany w układzie oddechowym przez szereg komórek: m.in. przez komórki nabłonka oskrzeli, komórki nerwowe, komórki uczestniczące w procesie zapalnym w drzewie oskrzelowym, komórki śródbłonka naczyń oraz przez komórki mięśni gładkich (8, 11). Tlenek azotu powstaje w wyniku reakcji utleniania L-argininy katalizowanej przez enzym cytoplazmatyczny – syntazę tlenku azotu (NOS) w obecności szeregu kofaktorów (2, 5). Znane są trzy izoformy NOS: NOS I, NOS II, NOS III. Pierwsza z nich, neuronalna syntaza NO (nNOS), a także trzecia – śródbłonkowa (eNOS), katalizują wytwarzanie NO w stanie fizjologii. Powstający wówczas NO jest odpowiedzialny za przekąźnictwo

nerwowe (neurotransmitter), regulację napięcia mięśni gładkich dróg oddechowych i naczyń krwionośnych (4, 14, 20). Drugi typ izoforny syntazy NO, tzw. iNOS (inducible), obecna jest w cytoplazmie komórek nabłonka, śródbłonka oraz w makrofagach i innych komórkach uczestniczących w procesie zapalnym (4, 5, 16, 25). Jest ona aktywowana w tych komórkach pod wpływem wielu cytokin prozapalnych np. u chorych na astmę (11, 12) oraz u chorych na rozstrzenie oskrzeli (7, 12), w wyniku czego istotnie wzrasta stężenie NO w powietrzu wydechowym (eNO).

Ostatnio pojawiły się doniesienia na temat oznaczania eNO także w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (3), nadciśnieniu płucnym (20), samoistnym włóknieniu płuc (18, 20) oraz w sarkoidozie (15, 17). U chorych na sarkoidozę potencjalnym źródłem iNOS mogą być makrofagi pęcherzykowe. Przypuszcza się, że towarzyszący procesowi zapalenia pęcherzyków (alveolitis) wzrost aktywności IFN-gamma i TNF-alfa w sarkoidozie może nasilać ekspresję iNOS w makrofagach (15, 17). Podobne zjawiska obserwowane są u chorych na gruźlicę płuc, u których obserwowano wzrost stężeń NO w powietrzu wydechowym (10, 23).

Celem pracy była ocena wartości stężeń NO w powietrzu wydechowym (eNO) u chorych na sarkoidozę.

## **Material i metodyka**

Badaniami objęto 22 chorych na sarkoidozę (8 kobiet i 14 mężczyzn) w wieku 26-46 lat. U wszystkich chorych rozpoznanie sarkoidozy potwierdzono badaniem histopatologicznym materiału biopsyjnego węzłów chłonnych okolicy mięśni pochyłych, oskrzeli lub mięszu płuc po wykluczeniu ekspozycji na pyły pochodzenia nieorganicznego lub organicznego i wykluczeniu gruźlicy czy też grzybicy płuc. W badanej grupie u 4 chorych stwierdzono I stopień zmian radiologicznych (powiększone węzły wnęk), u 7 stwierdzono II stopień zaawansowania zmian (powiększenie węzłów i zmiany rozsiane) a u 11 chorych stwierdzono III stopień zaawansowania zmian (zmiany rozsiane w płucach). Według kryteriów ATS/ERS/WASOG (6) u 16 chorych stwierdzono aktywną sarkoidozę, u 6 nieaktywną. U 10 chorych istniały wskazania do leczenia, które ustalono na podstawie upośledzenia wyników badań czynnościowych, progresji radiologicznej oraz nasilonych objawów klinicznych. Żaden z chorych nie był wcześniej leczony glikokortykosteroidami, nie palił aktualnie papierosów, a czas choroby ustalony na podstawie dostępnej dokumentacji radio-klinicznej nie przekraczał 2 lat. Grupę kontrolną stanowiło 11 zdrowych, niepalących ochotników bez cech atopii i przebytych chorób płuc.

Na przeprowadzenie badań w grupie zdrowych i chorych uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Śląskiej Akademii Medycznej.

Pomiaru eNO u chorych i w grupie kontrolnej dokonano aparatem SIEVIERS 280 NITRIC OXIDE ANALYZER (NOA) (USA) według metodyki zalecanej przez ERS (9). Aparat SIEVIERS 280 NOA jest wysokiej czułości detektorem mierzącym stężenie eNO, wykorzystującym reakcję chemiluminescencji w fazie gazowej między tlenkiem azotu a ozonem. Emisja ze wzbudzonego dwutlenku azotu jest wykrywalna w paśmie czerwieni i blisko podczerwieni przez czuły analizator połączony z komputerem. Czułość dla pomiarów NO w fazie

gazowej jest mniejsza niż 1 ppb (parts per billion- cząsteczka/bilion).

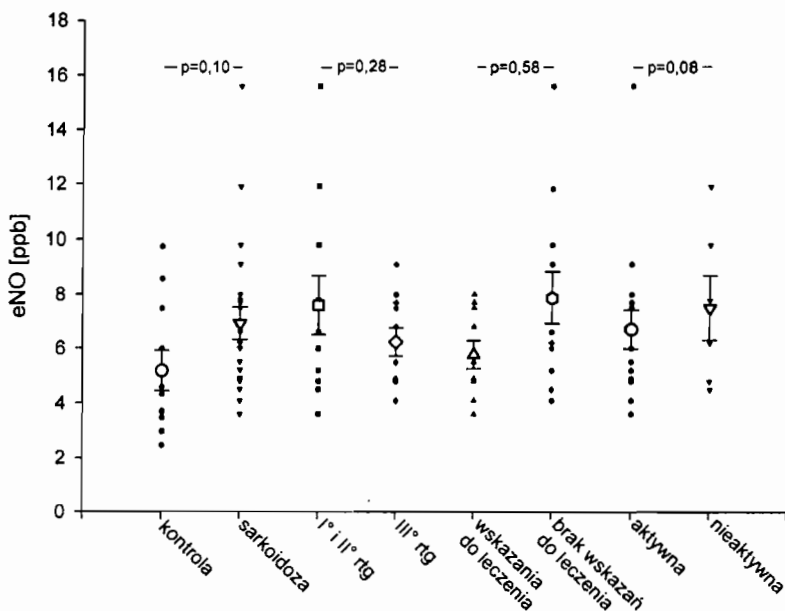
Analizę eNO przeprowadzano, po wykonaniu przez badanego spokojnego maksymalnego wdechu („pozycja” TLC), w czasie wydechu aż do „pozycji” RV. W czasie pomiaru utrzymywano w jamie ustnej stałe ciśnienie 10 cm H<sub>2</sub>O. Technika ta zabezpiecza przed ewentualną domieszką NO pochodzącego z nosa. U każdego badanego dokonywano 6 pomiarów i wyciągano średnią.

Wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  błąd standardowy średni (SEM).

Do analizy statystycznej wykorzystano test t-studenta dla wartości niezależnych po uprzednim sprawdzeniu normalności rozkładu. Za poziom istotności przyjęto  $p < 0,05$ .

**Wyniki** Chorych z I i II stopniem zaawansowaniem zmian rtg rozpatrywano łącznie jako 11 osobową grupę chorych (I+II rtg).

Średnie wartości stężeń eNO w całej grupie chorych ( $6,91 \pm 0,60$  ppb) nie różniły się istotnie od uzyskanych w grupie kontrolnej ( $5,2 \pm 0,73$  ppb). Stężenia eNO u chorych z I i II stopniem zmian rtg ( $7,5 \pm 1,08$  ppb) były zbliżone do średnich stężeń eNO u chorych ze stopniem III zmian rtg ( $6,2 \pm 0,51$  ppb). Także średnie wartości stężenia eNO u chorych na sarkoidozę aktywną ( $6,7 \pm 0,71$  ppb) nie różniły się znamienne w porównaniu do stężeń eNO obserwowanych u chorych na nieaktywną sarkoidozę ( $7,5 \pm 1,10$  ppb). Nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnimi wartościami eNO u chorych ze wskazaniami do leczenia ( $5,77 \pm 0,50$  ppb) w porównaniu do stężeń eNO u chorych bez wskazań do leczenia ( $7,8 \pm 0,95$  ppb). (ryc.1)



Ryc. 1 Stężenie eNO w poszczególnych grupach chorych na sarkoidozę  
Fig. 1 Concentration of eNO in particular group of patients with sarcoidosis

**Omówienie**

Nasze wstępne wyniki pomiarów eNO u chorych na sarkoidozę nie wykazały istotnej różnicy w stężeniach eNO u chorych i w grupie kontrolnej. Podobne rezultaty uzyskał O'Donnell i wsp. (17), który obserwował zbliżone stężenia eNO oraz podobne stężenia jonów  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) u 10 chorych na sarkoidozę i w grupie kontrolnej. Natomiast Moodley i wsp. (15) stwierdził w dwunastoosobowej grupie chorych na sarkoidozę istotnie większe stężenia eNO w porównaniu do zdrowych. Badania Moodley'a dotyczyły głównie chorych rasy czarnej (10 osób) na aktywną, postępującą, wielonarządową sarkoidozę i ze znacznym czynnościowym uszkodzeniem płuc i innych zajętych narządów. Być może taki dobór grupy był przyczyną odmiennych od naszych wyników. Badani przez nas chorzy mieli tylko płucną lokalizację zmian sarkoidalnych, a stopień upośledzenia czynnościowego u chorych ze wskazaniami do leczenia był umiarkowany (DCO od 66 do 79% należnej). Zarówno Moodley (15) jak i cytowany wcześniej O'Donnell (17) przeprowadzali swoje badania przy pomocy angielskiego aparatu LR 2000 NOA Logan Research o podobnej zasadzie działania i czułości jak Sievers 280 NOA. Wartości stężeń eNO obserwowane przez O'Donnella (17) u chorych ( $7,8 \pm 4,4$  ppb) i w grupie kontrolnej ( $7,1 \pm 4,2$  ppb) są tylko niewiele wyższe od stwierdzanych u naszych badanych. Podkreślenia wymaga fakt, że stosunkowo duże średnie wartości eNO w sarkoidozie ( $9,8 \pm 0,4$  ppb) odnotowane w badaniach Moodley'a (15) są prawie dwukrotnie niższe od stężeń eNO obserwowanych u chorych na gruźlicę płuc (23) oraz u chorych na astmę oskrzelową, u których stężenia eNO wynosić mogą średnio ok. 22 ppb (8, 11, 12, 13). Zresztą w astmie oskrzelowej stężenie eNO wykorzystywane jest już nawet jako jeden z markerów stanu zapalnego oskrzeli (8, 11, 12). W astmie oskrzelowej głównym źródłem NO są komórki nabłonka oskrzeli (5, 8), a zatem dyfuzja NO do światła dróg oddechowych nie jest utrudniona. Natomiast w sarkoidozie zasadniczym miejscem syntezy NO wydają się być makrofagi oraz ziarniniaki sarkoidalne zlokalizowane wzdłuż pęczków naczyniowo-oskrzelowych co może być przyczyną utrudnionej dyfuzji NO do światła oskrzeli i w następstwie stosunkowo niskich stężeń NO w powietrzu wydechowym (17). W gruźlicy płuc zwiększenie eNO jest najpewniej spowodowane istotnym zwiększeniem ekspresji iNOS w makrofagach płucnych po ich aktywacji przez cytokiny i produkty prątki np. lipoarabinomannan LAM (10, 23). Natomiast u chorych na sarkoidozę indukcja iNOS najpewniej nie występuje w takim stopniu jak u chorych na gruźlicę, co może mieć związek z dojrzałością makrofagów. Stwierdzono bowiem, że największa ekspresja iNOS ma miejsce w makrofagach dojrzałych, a przeciwnie w sarkoidozie wiele makrofagów wykazuje fenotyp pośredni między monocytami a dojrzałymi makrofagami (1,22). Być może na niskie stężenia eNO rzutuje także szybkie łączenie NO wytwarzanego przez makrofagi z hemem zawartym w erytrocytach kapilar w płucnych naczyniach włosowatych i krótki, 0,1-5s, czas półtrwania NO *in vivo* (5, 16).

Podkreślenia wymaga fakt, że wpływ na stężenie NO w powietrzu wydechowym ma dym tytoniowy, ponieważ znajdujący się w dymie NO hamuje zwrotnie ekspresję iNOS (24). W naszej grupie chorych jedynie 5 osób paliło papierosy w przeszłości, tak więc nie sądzimy, aby wpłynęło to na uzyskane wartości

stężen eNO. Hamujący wpływ na iNOS mają także glikokortykosteroidy wziewne, których stosowanie u chorych na astmę powoduje obniżenie stężeń eNO (11, 13). Nasi chorzy nie byli jednak leczeni glikokortykosteroidami.

Uzyskane przez nas wyniki badań przeprowadzone w dwudziestodwuosobowej grupie chorych na sarkoidozę sugerujące nikłą przydatność pomiarów eNO traktujemy jednak jako wstępne. Sądzymy, że sformułowanie ostatecznych wniosków o znaczeniu eNO w sarkoidozie może wymagać jeszcze przeprowadzenia badań w grupie chorych z sarkoidozą przewlekłą w IV stopniu zmian rtg i określenia korelacji pomiędzy stężeniami eNO a stężeniami jonów NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> w BAL-u.

### Wniosek

Wstępne wyniki badań wskazują na małą przydatność oznaczania stężeń eNO u chorych na sarkoidozę.

### Piśmiennictwo

1. Bilyk N., Holt P.G.: Cytokine modulation of the immunosuppressive phenotype of pulmonary alveolar macrophage population. *Immunology* 1995, 86, 231-237
2. Borland C., Cox Y., Higenbottam T.: Measurement of exhaled nitric oxide in man. *Thorax* 1993, 48, 1160-1162.
3. Clini E. i wsp.: Endogenous nitric oxide in patients with stable COPD. *Thorax* 1998, 53, 881-883.
4. Dweik R.A., Laskowski D., Husam M.: Nitric oxide synthesis in the lung. *J Clin Invest* 1998, 100, 660-666.
5. Gaston B. i wsp.: The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149, 538-551
6. Hunninghake G.W., Costabel U., Ando M. i wsp.: ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases*. 1999, 16, 149-173.
7. Kharitonov S.A. i wsp.: Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995, 151, 1889-1893.
8. Kharitonov S.A.: Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from lower respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153, 1773-1780.
9. Kharitonov S.A., Alving K., Barnes P.J.: Exhaled and nasal nitric oxide measurements - recommendations. *Eur Respir J* 1997, 10, 1683-1693
10. Kuo H.P. i wsp.: Nitric oxide modulates IL-1beta and TNF-alfa synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161, 192-9.
11. Landry J.S., Eidelman D.: Nitric oxide, oxidants and asthma. *RT International Spring*. 2001 Issue, 19-24.
12. Lim S. i wsp.: Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic inflammation in mild to moderately severe asthma. *Thorax* 2000, 55, 184-188.
13. Little S.A. i wsp.: Non-invasive markers of airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma. *Thorax* 2000, 55, 232-234.
14. Moncada S., Palmer R., Higgs E.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991, 43, 2.
15. Moodley Y.P., Chetty R., Lalloo U.G.: Nitric oxide levels in exhaled air and inducible nitric oxide synthase immunolocalization in pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999, 14, 822-827.
16. Nathan C., Owen X.: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1995.
17. O'Donnell D.M., Moynihan J., Finlay G.: Exhaled nitric oxide and bronchoalveolar-lavage nitrite/nitrate in active pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156, 1892-1896.
18. Paredi P. i wsp.: Exhaled nitric oxide increased in active fibrosing alveolitis. *Chest* 1999, 115, 1352-1356.
19. Quinn A.C., Petros J., Vallance P.: Nitric oxide: an endogenous gas. *Brit J Anaesth* 1995, 74, 443-445.
20. Riley M. i wsp.: Exhaled nitric oxide during exercise in pulmonary primary hypertension and pulmonary fibrosis. *Chest* 1997, 111, 44-50.

## eNO u chorych na sarkoidozę

21. Robbins R.A. i wsp.: Smoking cessation is associated with increase in exhaled nitric oxide. Chest 1997, 112, 313-318.
22. Spiteri M., Clarce S., Poulter.: Alveolar macrophages that suppress T-cell responses may be crucial to the pathogenetic outcome of pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J 1992, 4, 394-403.
23. Wang C.H. i wsp.: Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. Eur Respir J 1998, 11, 809-815.
24. Verleden G.M. i wsp.: The effect of cigarette smoking on exhaled NO in mild steroid asthma. Chest 1999, 116, 332-336
25. Zapol W.M. i wsp.: Nitric oxide and the lung. Am J Respir Crit Care Med 1994, 149, 1375-1380.

Wpłynęła: 7.11.2001

Adres: Klinika Ftizjopneumonologii SLAM, ul. Koziółka 1, Zabrze

## **KOMUNIKAT KOMUNIKAT KOMUNIKAT KOMUNIKAT KOMUNIKAT KOMUNIKAT**

### **Koleżanki/Koledzy**

Na ostatnim Plenum Zarządu Głównego zmieniono wcześniej przyjęte zasady opłaty za przynależność do Towarzystwa. Pragnę przypomnieć, że w opłacie tej była suma pieniędzy przewidziana na prenumeratę „Pneumonologii i Alergologii Polskiej”. Obecna zmiana powoduje to, że płacimy nadal składkę członkowską w Zarządzie oddziału. Liczymy na to, że każdy z Członków Towarzystwa zaprenumeruje osobiście czasopismo „Pneumologia i Alergologia Polska”. Pragnę przypomnieć, że prenumerata naszego czasopisma jest obowiązkiem statutowym. Wynosi ona rocznie 60 zł. Liczymy również na aktywny udział w wydawaniu czasopisma.

*Prezes Polskiego Towarzystwa Ftizjopneumonologicznego  
– Dr hab. n.med. Jerzy Kozielski*

## **KOMUNIKAT KOMUNIKAT KOMUNIKAT KOMUNIKAT KOMUNIKAT KOMUNIKAT**