



Biomarker esalati*

Sergei A. Kharitonov, MD, PhD; Peter J. Barnes, DM, DSc, FCCP

La valutazione dell'infiammazione delle vie aeree e polmonare è importante per studiare i meccanismi alla base di asma e BPCO. Ancora essa non può essere misurata direttamente nella ricerca e nella pratica clinica a causa delle difficoltà nel monitoraggio dell'infiammazione. Il monitoraggio non invasivo può aiutare a riconoscere precocemente asma e BPCO, a valutare la loro gravità e la risposta al trattamento, in particolare durante le riacutizzazioni di malattia. Vi sono sempre più prove che l'analisi del respiro possa ricoprire un ruolo importante nella gestione clinica di asma e BPCO. L'articolo esamina il ruolo delle attuali misurazioni non invasive dei gas esalati, come l'ossido nitrico (NO), i marker infiammatori nel condensato dell'esalato (EBC) e la temperatura dell'esalato, così come le nuove metodiche per il monitoraggio ed il trattamento di asma e BPCO.

(CHEST Edizione Italiana 2007; 1:65-70)

Parole chiave: asma; BPCO; esalato condensato; ossido nitrico esalato

Abbreviazioni: CALV = ossido nitrico periferico; COX = ciclossigenasi; EBC = concentrato dell'esalato; FENO = frazione esalata di ossido nitrico; ICS = corticosteroidi inalatori; iNOS = NO sintetasi inducibile; LTB₄ = leukotriene B₄; MEFT = tecnica di espirazione a flussi multipli; NO = ossido nitrico; NOS = NO sintetasi

I biomarker sono indicatori misurabili e valutabili oggettivamente dei normali processi biologici, dei processi patologici o delle risposte farmacologiche ad un intervento terapeutico. Misurare i biomarker nel respiro rappresenta un approccio molto attraente per monitorare l'infiammazione di asma¹ e BPCO dato che non è invasivo e rende possibile un campionamento ripetuto.^{2,3} Tuttavia, vi sono problemi im-

portanti riguardo la riproducibilità, la variabilità e la sensibilità che devono essere affrontati prima che questo approccio possa essere raccomandato come misura di outcome. Vi sono relativamente poche notizie su come uno qualunque di questi biomarker interagisca con gli altri outcome clinici, come la progressione della malattia, la gravità della malattia, i sottotipi clinici o la risposta alla terapia. In futuro, queste nuove tecniche potranno essere utili per predire la progressione della malattia, indicare l'instabilità della malattia e predire la risposta alle attuali e alle future terapie, molte delle quali sono tuttora in via di sviluppo.

OSSIDO NITRICO ESALATO

La frazione esalata di ossido nitrico (FENO) è stata studiata in maniera estesa nell'asma e si è dimostrata la correlazione con l'infiammazione delle vie aeree a prevalenza eosinofila e la sua riduzione dopo terapia corticosteroidica. Esistono delle raccomandazioni per la misurazione della FENO dell'European Respiratory Society e dell'American Thoracic Society.⁴ La misurazione è ampiamente riproducibile in soggetti normali ed asmatici se viene posta molta attenzione alla tecnica.⁵

*Dal National Heart & Lung Institute, Imperial College, Royal Brompton Hospital, Londra, UK.

Il Dr. Kharitonov è membro dei comitati di consulenza scientifica per Aerocrine, e ha ricevuto compensi per le proprie letture da Aerocrine, AstraZeneca, MSD, e finanziamenti per la ricerca da GlaxoSmithKline, AstraZeneca, Suska, MSD e Aerocrine. Il Dr. Barnes ha dichiarato all'ACCP che non esistono significativi conflitti di interesse con qualunque compagnia/organizzazione i cui prodotti o servizi possano essere discussi in questo articolo.

Manoscritto ricevuto l'11 aprile 2006; revisione accettata il 7 agosto 2006.

La riproduzione di questo articolo è vietata in assenza di autorizzazione scritta dell'American College of Chest Physicians (www.chestjournal.org/misc/reprints.shtml).

Corrispondenza: Sergei A. Kharitonov, MD, PhD, Section of Airway Disease, National Heart & Lung Institute, Imperial College, Dovehouse St, London SW3 6LY, UK; e-mail: s.kharitonov@imperial.ac.uk

(CHEST 2006; 130:1541-1546)

Fino a poco tempo fa, non era possibile nessun monitoraggio domiciliare giornaliero della FENO, dato che non erano disponibili analizzatori semplici e portatili di ossido nitrico (NO). L'avvento degli analizzatori palmari che permettono la misurazione della FENO con accuratezza e riproducibilità sufficienti potrà cambiare considerevolmente l'attuale trattamento dell'asma, dato che la FENO potrà essere misurata quotidianamente dai pazienti al proprio domicilio e frequentemente durante le loro visite programmate presso il medico di medicina generale.⁶

Asma

Diagnosi: L'aumento della FENO, un marcatore delle vie aeree specifico di infiammazione a prevalenza eosinofila, non è esclusivo dell'asma ma può essere utilizzato con > 90% di specificità per la diagnosi di asma sia in adulti⁷ che in bambini.⁸ Tenendo presente la semplicità delle misurazioni in particolare con gli analizzatori portatili di NO, la FENO può essere utilizzata con costi contenuti per lo screening di ampie popolazioni. Tuttavia, devono essere tenuti in conto i livelli più bassi di NO in pazienti trattati con corticosteroidi inalatori (ICS), dato che ciò riduce la sensibilità dell'NO come strumento diagnostico. Al contrario, normali livelli di FENO permettono di distinguere i pazienti con tosse cronica non asmatica.

Monitoraggio dell'infiammazione delle vie aeree: I sintomi di asma atopico spesso cominciano nella prima infanzia e migliorano o sembrano scomparire nella maggior parte dei casi alla pubertà ma si ripresenteranno più avanti nel corso della vita. Questa infiammazione persistente ma allo stesso tempo latente, nota come rimodellamento delle vie aeree, conduce all'ispessimento della parete delle vie aeree e può essere responsabile dell'iperreattività bronchiale, che potrebbe avere un impatto determinante sulla progressione dell'asma. I livelli elevati di NO esalato, la conta degli eosinofili nel sangue e la risposta bronchiale all'adenosina-5'-monofosfato correlano in maniera significativa con la quantità di eosinofili tissutali in campioni broncoscopici ottenuti in adolescenti in fase di remissione clinica di asma atopico. Ciò significa che l'infiammazione e il rimodellamento delle vie aeree sono entrambi processi attivi anche in soggetti in remissione clinica, e possono essere rilevati e monitorati di routine attraverso la misurazione in clinica dell'NO esalato. Si può ipotizzare che i soggetti con infiammazione subclinica delle vie aeree⁹ ed elevati livelli di NO esalato possano trarre beneficio da un trattamento antinfiammatorio "precoce", prevenendo il successivo rimodellamento delle vie aeree e la progressione dell'asma.

Controllo: In misurazioni longitudinali, le variazioni della FENO correlavano in maniera significativa non solo con le variazioni degli eosinofili nell'espettorato e con l'iperreattività ma anche con la funzionalità respiratoria ed i sintomi asmatici.^{1,10} Il vantaggio della FENO come "marcatore di perdita di controllo" semplice da implementare è che l'aumento della FENO precede la caduta del picco di flusso espiratorio ed i sintomi asmatici. Il monitoraggio dell'asma può essere molto più accurato quando vengono effettuate misurazioni ripetute della FENO piuttosto che singole valutazioni; le variazioni della FENO correlano significativamente non solo con le variazioni degli eosinofili nell'espettorato e con l'iperreattività ma anche con la funzionalità respiratoria ed i sintomi asmatici. Dato che sono disponibili analizzatori portatili di NO esalato, è probabile che questa misura diventi routine nel monitoraggio dell'asma in medicina generale ed eventualmente per i pazienti a domicilio.

Trattamento: La FENO si comporta come marcatore "a rapida risposta" sensibile al trattamento steroideo dato che può essere ridotta in maniera significativa e dose dipendente 6 h dopo la nebulizzazione di una singola dose di budesonide,¹¹ o entro 2-3 giorni¹² di trattamento regolare con ICS. L'assenza di compliance o la cessazione del trattamento con ICS riporterà i valori di NO rapidamente (3-5 giorni) al livello pretrattamento;¹² grazie alle misurazioni della FENO è possibile ridurre in maniera significativa le dosi di mantenimento dei ICS senza compromettere il controllo dell'asma.¹³

Gli steroidi inalatori in terapie d'associazione (ICS più β -agonisti long-acting) rappresentano il trattamento di prima linea nell'asma, tranne negli Stati Uniti. È importante, tuttavia, monitorare l'infiammazione di fondo delle vie aeree, indipendentemente dalla funzionalità respiratoria ed i sintomi dei pazienti, perché essi sono influenzati dall'azione dei β -agonisti long-acting. Il dosaggio guidato dai sintomi degli steroidi inalatori in terapie d'associazione potrà essere utile in futuro, qualora la dose dello steroide possa essere determinata dal grado dei sintomi in un particolare momento. Noi suggeriamo che per adeguare le dosi della terapia d'associazione vengano utilizzate le misurazioni ripetute della FENO utilizzando un analizzatore portatile di NO basandosi dunque sul controllo dell'infiammazione asmatica.

BPCO

Normalmente la misurazione della FENO nella BPCO è di minore utilità, dato che i livelli sono di solito normali o solo leggermente aumentati, tranne durante le riacutizzazioni.² Recentemente la misura-

zione della FENO è stata estesa effettuando misurazioni dell'NO esalato a differenti flussi (tecnica di espirazione a flussi multipli [MEFT]), perciò è possibile separare l'NO flusso-indipendente e l'NO periferico (CALV) derivato dagli alveoli e probabilmente dalle piccole vie aeree. Utilizzando questa tecnica, è possibile dimostrare che mentre l'NO delle vie aeree è basso o normale nella BPCO, vi è un incremento del CALV che è correlato alla gravità della malattia e non è influenzato né dal fumo né dai ICS tradizionali.¹⁴ Ciò può riflettere l'aumento dell'NO sintetasi inducibile (iNOS) nella periferia dei polmoni di pazienti con BPCO. Tale CALV può dimostrarsi un utile biomarker non invasivo dell'infiammazione nella BPCO.

Aree cliniche di impiego dell'NO esalato nella BPCO

Rilevazione precoce dell'insorgenza di riacutizzazioni: La mancanza da parte del paziente di riferire una riacutizzazione, che si basa principalmente sui propri sintomi ed il colore dell'espettorato, aumenta significativamente il rischio di successive ospedalizzazioni d'urgenza ed è associata con una remissione più lenta. L'NO è aumentato nell'esalato del respiro sin dalle fasi molto precoci del raffreddore comune,^{15,16} che spesso innesca una riacutizzazione di BPCO. Teoricamente, gli analizzatori portatili di NO possono essere usati dai pazienti a domicilio per metterli in allerta, in aggiunta ai sintomi, così che un trattamento repentino migliori la remissione dopo la riacutizzazione (Figura 1). Chiaramente sono comunque necessari altri studi che utilizzano le altre tecnologie, ad esempio, la spettrometria/spettroscopia di massa portatile per differenziare le infezioni virali

da quelle batteriche, analizzando l'esalato del respiro attraverso un software creato per riconoscere tali quadri, allo scopo di iniziare un precoce ed adeguato trattamento.

Risoluzione dell'infiammazione delle vie aeree e polmonare: Il tempo di recupero medio dopo una riacutizzazione nei pazienti BPCO è di 10,7 giorni (da 1 a 2 settimane) attualmente calcolato in base a sintomi, purulenza dell'espettorato e funzionalità respiratoria. Una percentuale significativa di pazienti trattati per riacutizzazione di BPCO mostra un recupero incompleto, e le frequenti riacutizzazioni contribuiscono al declino della funzionalità respiratoria e allo scarso stato di salute. La colonizzazione batterica delle basse vie aeree in pazienti stabili con BPCO stimola l'infiammazione delle vie aeree, che porta ad un circolo vizioso protratto auto-perpetrantesi di danno polmonare progressivo e progressione della malattia. Noi ipotizziamo che la normalizzazione del CALV possa indicare il grado di remissione dalla colonizzazione batterica delle basse vie aeree e possa servire come predittore di scarso outcome se i livelli di CALV non rispondono al trattamento antibatterico.

Monitoraggio dell'infiammazione delle piccole vie aeree nella BPCO: L'NO esalato alveolare (CALV) può essere misurato in maniera riproducibile utilizzando la MEFT, è aumentato nella BPCO, riflette l'infiammazione delle vie aeree periferiche ed è correlato con la gravità della malattia. Le misurazioni MEFT della FENO sono ampiamente riproducibili, prive di variazioni circadiane, non influenzate da fumo, broncodilatatori o ICS,¹⁴ e di conseguenza possono essere usate per il monitoraggio della BPCO.

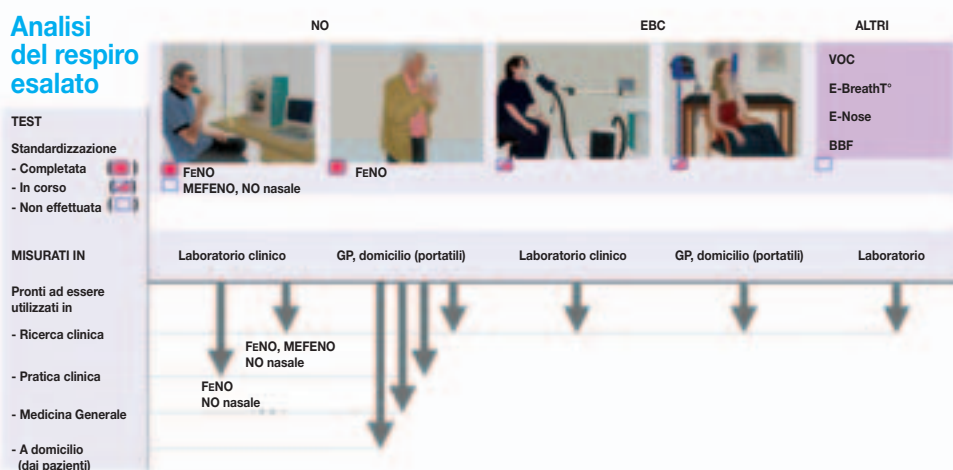


FIGURA 1. Analisi del respiro esalato: stato attuale di standardizzazione, ricerca ed impiego clinico. GP = medicina generale; MEFENO = NO con espirazione a flussi multipli; VOC = composti organici volatili. E-BreathT° = temperatura del respiro esalato; E-Nose = analisi del respiro del tipo naso elettronico; BBF = flusso sanguigno bronchiale.

Gravità e progressione della BPCO: L'aumento del CALV in funzione della gravità può essere dovuto ad una maggiore presenza di cellule iNOS-positive nelle pareti alveolari di pazienti con BPCO più grave ma non con enfisema grave, il quale presenta una più bassa percentuale di macrofagi alveolari iNOS-positivi rispetto ai pazienti con malattia più lieve.¹⁷ I pazienti di stadio II secondo la Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease hanno livelli di CALV¹⁴ simili a quelli dei pazienti con asma più grave, suggerendo meccanismi fisiopatologici simili e/o simile estensione dell'infiammazione delle vie aeree/polmoni che possono essere trattati con una terapia simile.

Modulatori dell'NO: L'effetto dell'NO può essere benefico o deleterio e sia gli inibitori dell'NO sintetasi (NOS) che i substrati dell'NOS possono avere un grosso potenziale terapeutico in condizioni patologiche steroido-resistenti come l'asma e la BPCO.¹⁶ Vi sono parecchie ragioni dietro al considerevole interesse nello sviluppo di nuovi composti che agiscano come donatori di NO in pazienti con malattie polmonari. L'NO svolge un ruolo importante sull'attività battericida nei polmoni, sul battito ciliare e sulla disfunzione ciliare. La soppressione della produzione di NO dovuta al fumo nella BPCO può contribuire alle infezioni toraciche ricorrenti in questi pazienti. Di conseguenza, un trattamento antiinfiammatorio (per esempio, un'associazione di corticosteroidi e donatori di NO) che preservi la produzione di NO può essere ottimale nell'asma e nella BPCO.

Substrati dell'NOS: L'assunzione di L-arginina è stata studiata in diverse situazioni cliniche in cui si desidera l'aumento della produzione di NO. Per esempio, l'L-arginina per os e inalatoria è stata utilizzata in soggetti normali e in pazienti con discinesia ciliare primitiva per migliorare l'attività battericida dei polmoni, il battito ciliare e la disfunzione muco-ciliare nella BPCO.

Effetto degli ICS: L'assenza di effetti degli ICS sul CALV¹⁴ rappresenta un vantaggio importante per le misurazioni MEFT della FENO nella BPCO nel monitoraggio del processo infiammatorio che è chiaramente diverso da quello dell'asma. Si può ipotizzare, tuttavia, che l'effetto antiinfiammatorio nella BPCO di alcune nuove formulazioni, quali per esempio l'associazione di beclometasone dipropionato con formoterolo, somministrati per aerosol di particelle di piccola dimensione, possa essere valutata con la MEFT.

Effetto del fumo: Il fumo può innescare la cascata infiammatoria nella BPCO ma non ha un effetto diretto sulla fonte del CALV, che di conseguenza può

fornire informazioni importanti aggiuntive per la valutazione del processo infiammatorio. Ciò potrà rendere in futuro questa tecnica particolarmente importante per la valutazione degli effetti antiinfiammatori delle nuove terapie per la BPCO.

CONDENSATO DEL RESPIRO ESALATO

Il condensato del respiro esalato (EBC) viene raccolto raffreddando o congelando l'aria esalata, una tecnica totalmente non invasiva. Questa procedura di raccolta è stata standardizzata,⁴ e vi sono forti evidenze che alterazioni della composizione dell'EBC possano riflettere le variazioni biochimiche del liquido di rivestimento delle vie aeree.¹⁸ Teoricamente, l'EBC può essere usato per valutare gli obiettivi delle moderne terapie nei trial clinici e per monitorare l'asma e la BPCO nella clinica.

Biomarker del respiro esalato nella ricerca clinica

Studio dei meccanismi di asma e BPCO: La prostaglandina E₂ e la prostaglandina F₂α nell'EBC sono decisamente aumentate nella BPCO ma non nell'asma.^{19,20} Al contrario, il leukotriene E₄ è aumentato nell'asma ma non è rilevabile in soggetti normali o in pazienti con BPCO.²¹ Di conseguenza, i profili nel respiro esalato dei vari biomarker esalati possono essere impiegati per differenziare i diversi meccanismi fisiopatologici.

L'inibizione non selettiva della ciclossigenasi (COX) riduce la PGE₂ e aumenta il leukotriene B₄ (LTB₄) nell'EBC della BPCO, mentre l'inibizione selettiva della COX-2 non ha effetti su questi eicosanoidi.²² Ciò suggerisce che esiste uno specifico meccanismo dietro l'inibizione della COX e il dirottamento del metabolismo dell'acido arachidonico verso la via della 5-lipossigenasi, che può essere studiato in maniera non invasiva in pazienti con BPCO.²¹

Impiego dell'EBC in Medicina Generale: Le concentrazioni di LTB₄ sono aumentate nell'EBC di pazienti con BPCO stabile e riacutizzazioni di BPCO, e ritornano normali durante il periodo di remissione.²³ È interessante, come i livelli di LTB₄ precipitano dopo il trattamento antibiotico e diventano simili a quelli dei soggetti normali non fumatori, riflettendo la riduzione durante il periodo di remissione dei marker neutrofili nelle vie aeree. Inoltre, i livelli di LTB₄ sono ridotti nei pazienti che non hanno avuto altre riacutizzazioni dopo 2 mesi, il che suggerisce che l'LTB₄ esalato possa essere utile nella valutazione non invasiva e nel monitoraggio dell'infiammazione in pazienti con BPCO.

Teoricamente, gli idrogenioni (pH) possono essere misurati nell'EBC come marker semplice di acidificazione che è molto ridotto nell'asma acuto²⁴ ed è

basso nella BPCO. Vi sono sempre più prove che la diluizione dei droplet respiratori in acqua e la potenziale contaminazione con l'ammoniaca prodotta in bocca²⁵ possano essere tranquillamente ignorate.

TEMPERATURA DEL RESPIRO ESALATO E FLUSSO SANGUIGNO BRONCHIALE

La temperatura del respiro esalato e il flusso sanguigno bronchiale riflettono il rubor e il calor delle vie aeree, e di conseguenza possono essere marker di infiammazione tissutale e di rimodellamento in asma e BPCO. Una più bassa temperatura del respiro, dopo l'inalazione di corticosteroidi, correlata con ridotti livelli di flusso sanguigno bronchiale,²⁶ può suggerire che queste misurazioni non invasive possono essere utili per valutare l'infiammazione delle vie aeree e fornire uno strumento per valutare la sensibilità agli steroidi.

ALTRE NUOVE TECNOLOGIE PER LA VALUTAZIONE DEI BIOMARKER ESALATI

Proteomica e metabonomica

Queste tecnologie non invasive offrono informazioni rapide sui meccanismi di risposta dei sistemi viventi nei confronti di qualunque esposizione (fumo, batterica/virale, trattamento) riguardo l'espressione proteica o la regolazione metabolica. Esse possono facilitare l'inserimento di dati clinici negli stadi più precoci dello sviluppo di un farmaco ed in particolare aiutare alla scoperta e alla caratterizzazione dei biomarker.

Biomarker in associazione

Di recente, è stato dimostrato che i giovani asmatici con normale funzionalità respiratoria ma significativa infiammazione delle vie aeree (FENO, 87,3 parti per miliardo)²⁷ hanno differenti gradi di alterazione dei livelli di chemiochine e LTB₄ misurati sia nel sangue che nell'EBC. Ciò suggerisce che i "biomarker in associazione" esalati possano essere capaci di differenziare il grado di infiammazione sistemica piuttosto che di quella locale. I biomarker in associazione (associazione della forza dell'approccio dell'EBC e dell'NO esalato, per esempio) potranno essere utili allo scopo di rendere più pratici alcuni biomarker prevalentemente orientati alla ricerca.

Rilevazione di piccole molecole ("naso elettronico")

L'odore o odor è stato utilizzato come un sintomo di malattia per secoli. Di recente, sono stati ritrovati nel respiro esalato di pazienti con tumore al polmone

e alla mammella particolari marker biochimici che sono distinguibili da quelli dei soggetti di controllo. Nondimeno, cani domestici addestrati sono stati capaci di rilevare tumori al polmone o alla mammella confermati con la biopsia con una specificità di 0,99 e 0,88, rispettivamente.²⁸ Abbiamo iniziato recentemente un nostro studio basato sulla spettrometria a ionizzazione a pressione atmosferica per esaminare la chimica del respiro esalato per identificare quali composti chimici possano identificare in maniera più accurata l'asma e la BPCO, includendo pazienti con e senza riacutizzazioni batteriche.

SVILUPPI FUTURI

Ad oggi, vengono analizzati generalmente in maniera isolata singoli marker esalati ma, come detto sopra, i marker sono presenti in maniera diversa nelle diverse malattie ed i differenti marker variano nella loro sensibilità a certe azioni, come una particolare terapia. Queste differenze in futuro potranno essere sfruttate man mano che verranno caratterizzati altri marker, cosicché ogni patologia possa avere un profilo caratteristico o impronte digitali di marker differenti potenzialmente diagnostici di asma e BPCO. Le terapie possono anche imporre un effetto caratteristico su questi marker e ciò potrà migliorare in futuro la specificità del trattamento, in particolare quando saranno disponibili trattamenti più potenti e specifici.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Kharitonov SA, Yates DH, Robbins RA, et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343:133-135
- 2 Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1693-1722
- 3 Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, et al. Pulmonary biomarkers in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:6-14
- 4 ATS Workshop proceedings: exhaled nitric oxide and nitric oxide oxidative metabolism in exhaled breath condensate. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:131-145
- 5 Kharitonov SA, Gonio F, Kelly C, et al. Reproducibility of exhaled nitric oxide measurements in healthy and asthmatic adults and children. *Eur Respir J* 2003; 21:433-438
- 6 Kharitonov SA. Exhaled markers of inflammatory lung diseases: ready for routine monitoring? *Swiss Med Wkly* 2004; 134:175-192
- 7 Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM. Prospective evaluation of the validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma. *Chest* 2003; 123:751-756
- 8 de Jongste JC. Surrogate markers of airway inflammation: inflammometry in paediatric respiratory medicine. *Paediatr Respir Rev* 2000; 1:354-360
- 9 van Den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, et al. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:2107-2113

- 10 Jones SL, Kittelson J, Cowan JO, et al. The predictive value of exhaled nitric oxide measurements in assessing changes in asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:738–743
- 11 Kharitonov SA, Barnes PJ, O'Connor BJ. Reduction in exhaled nitric oxide after a single dose of nebulised budesonide in patients with asthma [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:A799
- 12 Kharitonov SA, Donnelly LE, Montuschi P, et al. Dose-dependent onset and cessation of action of inhaled budesonide on exhaled nitric oxide and symptoms in mild asthma. *Thorax* 2002; 57:889–896
- 13 Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352:2163–2173
- 14 Brindicci C, Ito K, Resta O, et al. Exhaled nitric oxide from lung periphery is increased in COPD. *Eur Respir J* 2005; 26:52–59
- 15 Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory infections. *Eur Respir J* 1995; 8:295–297
- 16 Kharitonov SA, Barnes PJ. Nitric oxide, nitrotyrosine, and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003; 3:121–129
- 17 van Straaten JF, Postma DS, Coers W, et al. Macrophages in lung tissue from patients with pulmonary emphysema express both inducible and endothelial nitric oxide synthase. *Mod Pathol* 1998; 11:648–655
- 18 Montuschi P. Exhaled breath condensate analysis in patients with COPD. *Clin Chim Acta* 2005; 356:22–34
- 19 Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, et al. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003; 58:585–588
- 20 Montuschi P, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:615–620
- 21 Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, et al. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003; 58:585–588
- 22 Montuschi P, Macagno F, Parente P, et al. Effects of cyclo-oxygenase inhibition on exhaled eicosanoids in patients with COPD. *Thorax* 2005; 60:827–833
- 23 Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 2003; 58:294–298
- 24 Hunt JF, Fang K, Malik R, et al. Endogenous airway acidification: implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(3 pt 1):694–699
- 25 Effros RM. Do low exhaled condensate NH₄⁺ concentrations in asthma reflect reduced pulmonary production? *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:91–92
- 26 Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Correlation of exhaled breath temperature with bronchial blood flow in asthma. *Respir Res* 2005; 6:15
- 27 Leung TF, Wong GW, Ko FW, et al. Clinical and atopic parameters and airway inflammatory markers in childhood asthma: a factor analysis. *Thorax* 2005; 60:822–826
- 28 McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, et al. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. *Integr Cancer Ther* 2006; 5:30–39