

Tlenek azotu w powietrzu wydychanym u chorych na alergiczny sezonowy nieżyt nosa

Exhaled nitric oxide in patients with seasonal allergic rhinitis

ZIEMOWIT ZIĘTKOWSKI, ANNA BODZENTA-ŁUKASZYK, MARIA MAGDALENA TOMASIAK

Klinika Alergologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej, ul. Skłodowskiej 24A, 15-276 Białystok

Wprowadzenie. Pomiar stężenia tlenku azotu (NO) w powietrzu wydychanym znajdują coraz większe zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu leczenia u chorych na astmę. Alergiczny sezonowy nieżyt nosa (ASNN) jest czynnikiem ryzyka rozwoju astmy i często z nią współistnieje.

Cel pracy. Ocena stężenia NO w powietrzu wydychanym w aspekcie monitorowania zapalenia dolnych dróg oddechowych u chorych na ASNN oraz korelacja ewentualnych zmian z wynikami badań spirometrycznych.

Material i metody. Badania przeprowadzono w grupie 45 chorych na ASNN, uczulonych na alergeny pyłków traw. Badani zgłaszali typowe objawy ASNN oraz obecność takich dolegliwości, jak duszności, świsły, kaszel, spadek tolerancji wysiłku. Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników. Każdy z badanych miał wykonywany przed sezonem pylenia oraz w trakcie jego trwania pomiar stężenia NO w powietrzu wydychanym oraz badanie spirometryczne i „score” objawów. Pomiar stężenia NO w powietrzu wydychanym wykonano metodą chemiluminescencji fazy gazowej reakcji pomiędzy NO a ozonem.

Wyniki. Średnie stężenie wydychanego NO przed okresem pylenia było istotnie wyższe u chorych na ASNN w porównaniu z grupą zdrowych ochotników. Badania powtórzone w czasie trwania sezonu pylenia traw wykazały istotny statystycznie wzrost stężenia NO. Obserwowane zmiany korelowały z występowaniem i stopniem nasilenia objawów astmatycznych, nie korelowały natomiast z nasileniem objawów ASNN. Analiza wyników badań spirometrycznych wykonanych przed i w okresie pylenia nie wykazała istotnych statystycznie różnic. Obserwowano jedynie tendencję do obniżenia MEF 50 u chorych na ASNN w sezonie pylenia traw.

Wnioski. Ocena stężenia NO w powietrzu wydychanym jest przydatnym badaniem w monitorowaniu zapalenia dolnych dróg oddechowych u chorych na ASNN.

Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(2), 93-98

Słowa kluczowe: *alergiczny sezonowy nieżyt nosa, tlenek azotu, astma*

Introduction. The measurement of exhaled nitric oxide (NO) has been increasingly used for diagnosing and monitoring of treatment in asthmatic patients. Seasonal allergic rhinitis is related to asthma and it is a risk factor for the development of that disease.

Aim of the study. The aim of the study was to evaluate exhaled nitric oxide concentration in patients with seasonal allergic rhinitis before and during pollen season and establish possible correlation between NO concentration and spirometric parameters as well as symptom scores.

Material and methods. The study was performed in the group of 45 patients with seasonal allergic rhinitis (SAR; grass pollen allergy) and 20 healthy volunteers. Patients reported typical symptoms of allergic rhinitis accompanied by such complaints and signs as dyspnoea, wheezes, cough, and reduced exercise tolerance. Exhaled NO was measured, spirometry was performed and symptom score determined in each patient before and during the pollen season. The measurement of exhaled NO was performed by the method involving determination of the gaseous phase luminescence of the NO reaction with ozone.

Results. It was found that the mean concentration of exhaled NO before pollen season was significantly higher in patients with seasonal allergic rhinitis than in healthy volunteers. Measurements repeated during grass pollen season revealed statistically significant rise of exhaled NO concentration. These changes correlated with asthmatic symptoms and their intensity, but there was no correlation between exhaled NO and symptoms of allergic rhinitis. Results of spirometry obtained before and during pollen season did not show statistically significant differences. The tendency to lower MEF50 was observed in patients with allergic rhinitis during pollen season.

Conclusion. The evaluation of exhaled NO concentration seems to be an important diagnostic parameter which is helpful for diagnosing allergic inflammation in patients with seasonal allergic rhinitis.

Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(2), 93-98

Key words: *seasonal allergic rhinitis, nitric oxide, asthma*

Badania epidemiologiczne [1] dostarczyły wielu dowodów na częste współistnienie alergicznego sezonowego nieżyty nosa (ASNN) i astmy. ASNN stanowi czynnik ryzyka rozwoju astmy. Wykazano związek czasowy między początkiem objawów ASNN a astmą [2]. Objawy ASNN często poprzedzają wystąpienie astmy, a ich pojawienie się w pierwszych latach życia jest wyrazem podatności na choroby atopowe, które mogą się rozwijać pod wpływem narażenia na czynniki środowiskowe [1]. Ryzyko rozwoju astmy jest nawet 3-krotnie większe u chorych na ANN w porównaniu z grupą kontrolną [2]. W patogenezie astmy i ASNN kluczową rolę odgrywa proces zapalny. Nacieki zapalne w błonie śluzowej nosa i oskrzeli mają podobny skład komórkowy (eozynofile, mastocyty, limfocyty T, komórki jednojądrzaste). W patogenezie zmian zapalnych błony śluzowej nosa i oskrzeli chorych na ANN i astmę biorą udział te same mediatory (histamina, leukotrieny cisteinylowe), cytokiny związane z limfocytami Th2 (interleukiny: 4, 5, 13, *GM-CSF*), chemokiny (RANTES, eotaksyna) i cząsteczki przylegania [3]. Komórki zapalne w indukowanej płwocinie stwierdzane są nie tylko w drogach oddechowych chorych na astmę, ale również w oskrzelach chorych na alergiczny sezonowy nieżyt nosa poza okresem pylenia [4]. W oskrzelach chorych na ANN bez objawów astmy, stwierdza się niewielkie zmiany zapalne i nieregularnie rozmieszczone obszary włóknienia. Wskazuje to na proces przebudowy dolnych dróg oddechowych podobny, chociaż mniej nasilony, do obserwowanego w astmie [5]. U wielu chorych na ANN obserwuje się nieswoistą nadreaktywność oskrzeli [6]. Wykonanie dooskrzelowej próby prowokacyjnej z alergenem odpowiedzialnym za występowanie objawów ASNN u chorych bez wywiadu astmy sezonowej, powoduje u części z nich wystąpienie wczesnej i późnej fazy astmatycznej [7]. W diagnostyce i monitorowaniu leczenia chorych na astmę coraz większe znaczenie mają nieinwazyjne metody oceny procesu zapalnego, a szczególnie stężenie tlenku azotu (NO) w powietrzu wydychanym. Oprócz komórek nerwowych, NO produkują komórki nabłonka układu oddechowego, śródbłonna naczyń krwionośnych oraz niektóre komórki pełniące istotną rolę w alergicznym procesie zapalnym [8].

Celem pracy była ocena stężenia NO w powietrzu wydychanym w monitorowaniu zapalenia dolnych dróg oddechowych u chorych na ASNN przed i w trakcie sezonu pylenia oraz korelacja ewentualnych zmian z wynikami badań spirometrycznych i „score” objawów.

PACJENCI I METODY

Pacjenci

Do badań zakwalifikowano 45 chorych z co najmniej dwuletnim wywiadem alergicznego sezonowego nieżyty nosa uczulonych na alergeny pyłku traw (dodatnie testy skórne metodą „Prick” – zestaw alergenowy firmy Al-

lergopharma). Z grupy badanej wykluczono pacjentów ze współistniejącym uczuleniem na alergeny całoroczne, palących papierosy oraz poddanych immunoterapii swoistej. Do badania nie zakwalifikowano chorych, którzy mieli rozpoznaną astmę lub też kiedykolwiek przyjmowali leki przeciwastmatyczne.

W skład badanej grupy wchodziło 19 mężczyzn (średnia wieku 23±11 lat) i 26 kobiet (średnia wieku 26±9 lat). Średni czas trwania objawów ASNN wynosił 4 lata dla grupy mężczyzn i 5 lat dla kobiet.

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych, niepalących ochotników z ujemnym wynikiem „Prick” testów z podstawowymi alergenami wziewnymi (10 mężczyzn, średnia wieku 22±2 lata i 11 kobiet, średnia wieku 23±2 lata).

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Białymstoku, nr zgody: R-I-003/187/2003.

Metody

W badanych grupach dwukrotnie (marzec-kwiecień i czerwiec 2003 roku) wykonano następujące badania:

1. Badanie spirometryczne za pomocą spirometru MasterScreen Pneumo PC firmy Jaeger. Oceniano następujące parametry spirometryczne: FEV1 (natężona pojemność wydechowa 1 sekundowa), MEF 50 (maksymalne przepływy wydechowe na poziomie drobnych oskrzeli).
2. Pomiar stężenia NO w powietrzu wydychanym wykonany za pomocą analizatora NO, model 280i firmy Sievers Instruments, Inc (USA). Pomiar stężenia NO w powietrzu wydychanym wykonano zgodnie z zaleceniami American Thoracic Society (ATS) – Am J Respir Crit Care Med 1999; 160: 2104-2117. Badania wykonywano wykorzystując technikę REB (*Restricted Exhaled Breath*), w której badany wykonuje spokojny, maksymalnie długi wydech przez specjalny ustnik z indywidualnie dobranym oporem (powoduje to uniesienie podniebienia miękkiego i pozwala na uniknięcie wpływu powietrza z jam nosowych na wynik badania). Wynik stanowi wartość średnią z trzech kolejnych pomiarów i jest podany w ppB (*parts per bilion*).

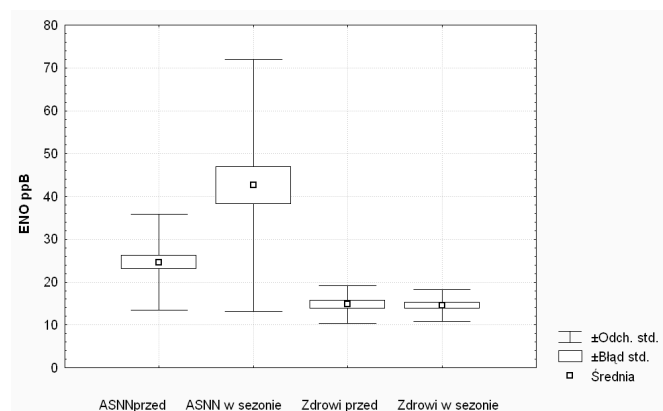
W czerwcu chorzy obserwowali nasilenie objawów ASNN (zatkanie nosa, wydzielina, świąd, kichanie), jak też obecność ewentualnych objawów ze strony dolnych dróg oddechowych (kaszel, duszność, świsty, spadek tolerancji wysiłku). Nasilenie objawów oznaczono jako: 0 – brak, 1 – łagodne, 2 – średnio-ciężkie, 3 – ciężkie. Po analizie kart obserwacji nasilenie zgłaszanych dolegliwości podawano jako średni tygodniowy „score” objawów.

Do opisu statystycznego uzyskanych wyników zastosowano: średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe (SD) oraz istotność statystyczną różnic dla dwóch średnich. Obliczenia wykonano za pomocą pakietu statystycznego

„Statistica 5.0”. Poziom istotności przyjęto dla $p < 0,05$. Porównania stężeń badanych parametrów dokonano używając nieparametrycznego testu Wilcozona dla próbek sparowanych o tej samej liczbie obserwowanych wartości. Do analizy korelacji pomiędzy badanymi parametrami użyto współczynnika korelacji liniowej Pearsona.

WYNIKI

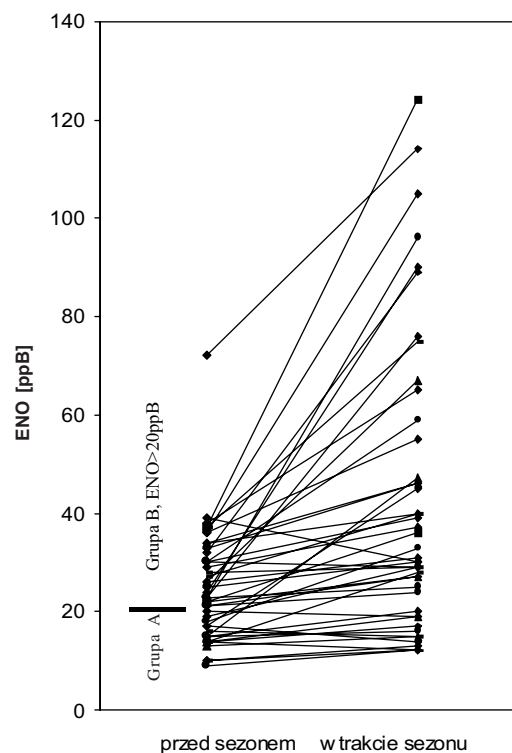
Analiza stężenia NO w powietrzu wydychanym przed sezonem pylenia traw wykazała znamienne statystycznie wyższe wartości w grupie chorych na ASNN w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami ($24,6\text{ppB} \pm 11,1$ v. $14,7\text{ppB} \pm 4,33$; $p < 0,05$). Badania powtórzone w czasie trwania sezonu pylenia wykazały wzrost stężenia NO w grupie chorych na ASNN ($24,6\text{ppB} \pm 11,1$ przed sezonem v. $42,6\text{ppB} \pm 29,45$ w czasie sezonu; $p < 0,05$). W grupie zdrowych ochotników zmian nie wykazano ($14,7\text{ppB} \pm 4,33$ przed sezonem v. $14,52\text{ppB} \pm 3,68$ w czasie sezonu; $p > 0,05$). Graficznie opisane zmiany przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Stężenie tlenku azotu w powietrzu wydychanym (ENO) w grupie chorych z ASNN oraz zdrowych ochotników przed i w trakcie sezonu pylenia traw

Zmiany stężenia NO w powietrzu wydychanym u poszczególnych chorych na ASNN przed i w trakcie sezonu pylenia przedstawiono na rycinie 2. Na podstawie stężenia NO uzyskanego przed sezonem pylenia, a także wzrostu obserwowanego w trakcie, chorych na ASNN podzielono na 2 grupy: A – 17 chorych (wyjściowe $\text{NO} \leq 20\text{ppB}$) i B – 28 chorych (wyjściowe $\text{NO} > 20\text{ppB}$). W obu grupach obserwowano wzrost stężenia NO (A: $14,7\text{ppB} \pm 3,07$ przed sezonem v. $21,52\text{ppB} \pm 11,52$ w czasie sezonu, $p < 0,01$; B: $30,64\text{ppB} \pm 9,91$ przed sezonem v. $55,39\text{ppB} \pm 29,85$ w czasie sezonu, $p < 0,00003$). W grupie B obserwowano istotnie statystycznie większy wzrost stężenia NO w powietrzu wydychanym w porównaniu z grupą A (B: $25,14 \pm 28,0$ v. A: $7,23 \pm 9,76$; $p < 0,05$).

Wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy pojawieniem się i nasileniem objawów ze strony dolnych dróg oddechowych (kaszel, duszności, świsty, spadek tolerancji wysiłku) a stężeniem NO w powietrzu wydycha-



Ryc. 2. Zmiany stężenia tlenku azotu w powietrzu wydychanym (ENO) u poszczególnych chorych na ASNN obserwowane w trakcie sezonu pylenia traw

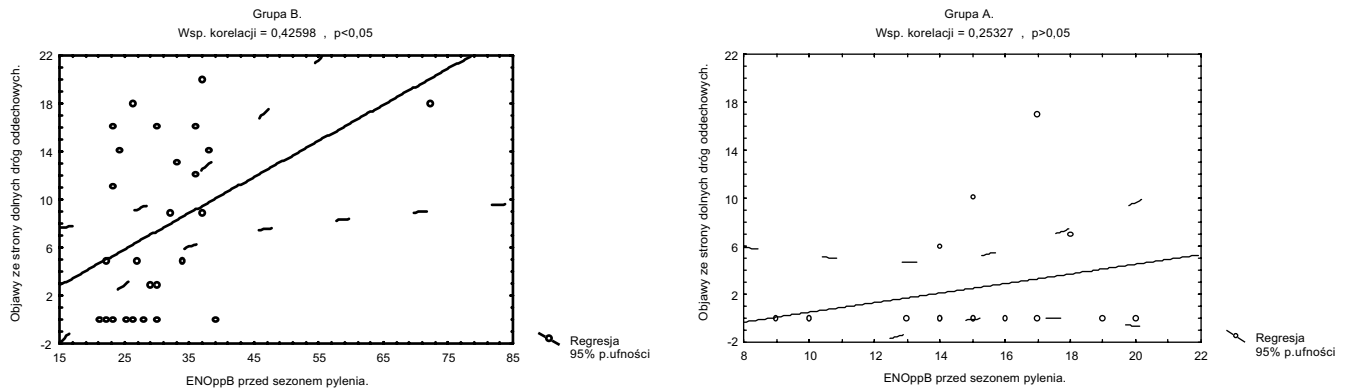
nym przed sezonem pylenia w grupie B ($\text{NO} > 20\text{ppB}$) ($r = 0,42$, $p < 0,05$). Analogicznej korelacji nie wykazano w grupie A ($\text{NO} \leq 20\text{ppB}$) ($r = 0,25$, $p > 0,05$) (ryc. 3).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy nasileniem objawów ASNN a stężeniem NO przed sezonem pylenia w obu grupach chorych na ASNN (grupa B: $r = -0,34$, $p > 0,05$; grupa A: $r = -0,06$, $p > 0,05$) (ryc. 4).

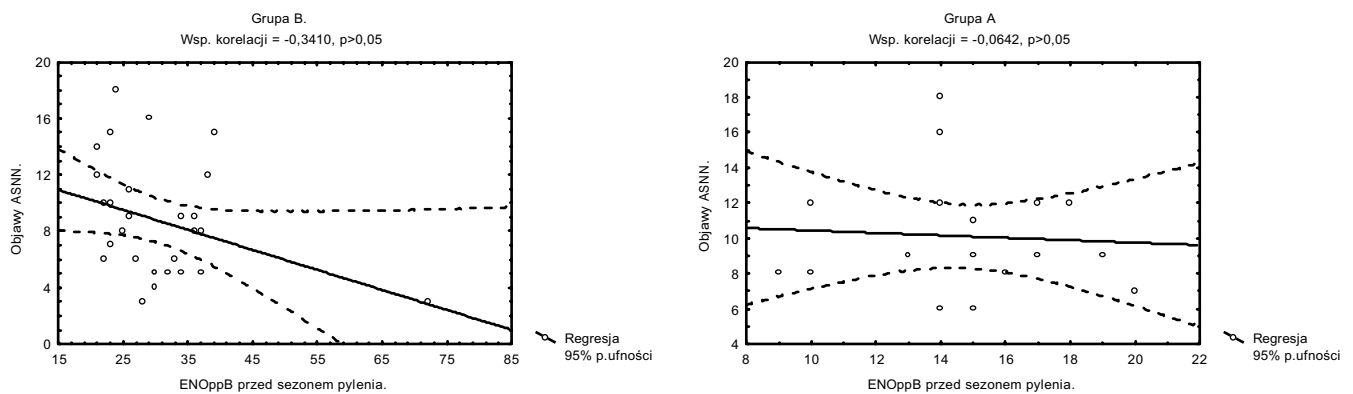
Wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy stężeniem NO w czasie trwania sezonu pylenia a nasileniem objawów ze strony dolnych dróg oddechowych w obu grupach chorych na ASNN (grupa B: $r = 0,87$, $p < 0,05$; grupa A: $r = 0,89$, $p < 0,05$) (ryc. 5).

Nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem NO w czasie trwania sezonu pylenia a nasileniem objawów ASNN (grupa B: $r = -0,10$, $p > 0,05$; grupa A: $r = -0,12$, $p > 0,05$) (ryc. 6). W grupie zdrowych ochotników nie obserwowano objawów ze strony układu oddechowego.

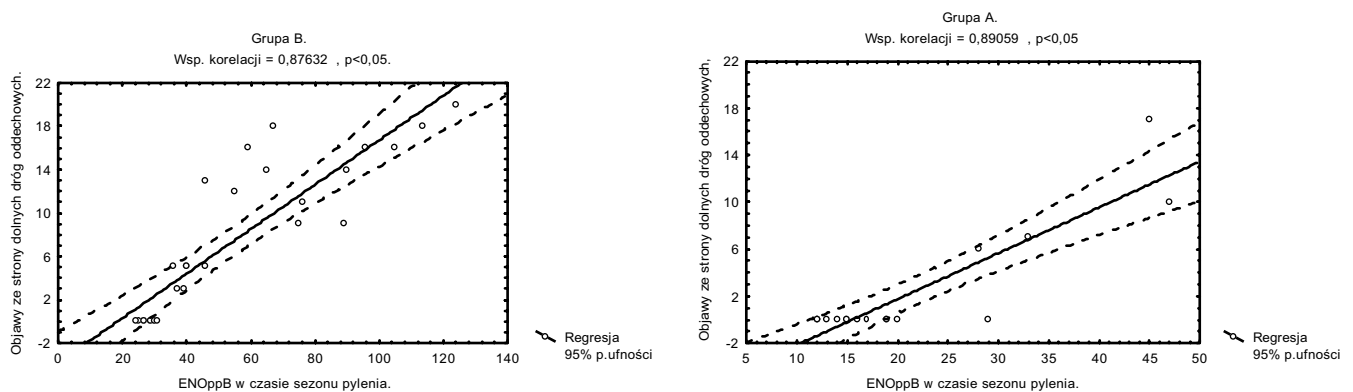
Analiza wyników badań spirometrycznych wykonanych przed i w okresie pylenia w obu badanych grupach nie wykazała istotnych statystycznie różnic. Obserwowano jedynie tendencję do obniżenia MEF 50 u chorych na ASNN w trakcie sezonu pylenia. Uzyskane wartości podano jako % wartości należącej. Chorzy na ASNN uzyskali przed sezonem FEV1 97 ± 11 , w trakcie sezonu pylenia 92 ± 14 , MEF 50 przed sezonem 93 ± 15 , w trakcie sezonu 80 ± 15 . Zdrowi ochotnicy uzyskali: przed sezonem FEV1 103 ± 10 , w trakcie sezonu pylenia 105 ± 12 , MEF 50 przed sezonem 99 ± 13 , w trakcie sezonu 100 ± 15 . Istotnych



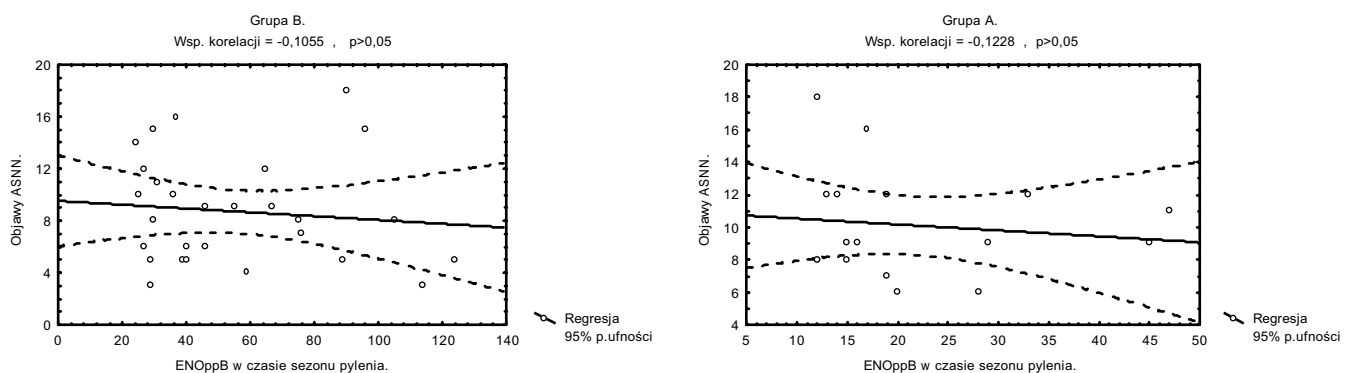
Ryc. 3. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem tlenku azotu w powietrzu wydychanym (ENO) przed sezonem pylenia a „score” objawów ze strony dolnych dróg oddechowych w czasie sezonu pylenia u chorych na ASNN



Ryc. 4. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem tlenku azotu w powietrzu wydychanym (ENO) przed sezonem pylenia a „score” objawów ASNN w czasie sezonu pylenia



Ryc. 5. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem tlenku azotu w powietrzu wydychanym (ENO) w czasie sezonu pylenia a „score” objawów ze strony dolnych dróg oddechowych u chorych na ASNN



Ryc. 6. Analiza korelacji pomiędzy stężeniem tlenku azotu w powietrzu wydychanym (ENO) w czasie sezonu pylenia a „score” objawów ASNN

statystycznie zmian nie obserwowano również w przypadku podziału grupy badanej na podgrupy A i B w zależności od uzyskanych wartości NO.

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały podwyższone stężenia NO w powietrzu wydychanym u niektórych chorych na ASNN uczulonych na pyłki traw przed sezonem pylenia. W trakcie naturalnej ekspozycji na uczulające alergeny obserwowano wzrost stężenia NO w powietrzu wydychanym, zwłaszcza u chorych z podwyższonymi wartościami wyjściowymi ($\text{NO} > 20 \text{ ppB}$). Podwyższone stężenia wydychanego NO korelowały z pojawieniem się oraz stopniem nasilenia objawów ze strony dolnych dróg oddechowych. Nie miały natomiast związku z ciężkością objawów ASNN.

Tlenek azotu jest biologicznie aktywną cząsteczką odgrywającą istotną rolę w fizjologii i patologii organizmu. Pełni kluczową rolę w fizjologicznej regulacji czynności układu oddechowego oraz w patogenezie astmy [9,10]. U chorych na astmę obserwuje się wzrost ekspresji indukowalnej formy syntazy NO (iNOS) oraz wzrost ilości NO w wydychanym powietrzu [11,12,13]. Frieri i wsp. uważają, że u chorych na astmę stężenie wydychanego NO może być ważnym wskaźnikiem w monitorowaniu leczenia przeciwzapalnego [14]. Van den Toorn traktuje pomiary wydychanego tlenku azotu jako wskaźnik procesu zapalnego oraz przebudowy oskrzeli u chorych na astmę, cenny zarówno w okresie objawowym, jak i bezobjawowym choroby [15].

Nieliczne prace wskazują na przydatność badania stężenia tlenku azotu w powietrzu wydychanym u chorych na alergiczny nieżyt nosa. Gratiou i wsp. opisali zarówno przed, jak i w trakcie sezonu pylenia wzrost stężenia NO w powietrzu wydychanym u chorych na ASNN, co może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia astmy

[16]. Doniesienia te potwierdzili Henriksen i wsp., którzy wykazali podwyższone stężenia NO u chorych na ASNN przed sezonem pylenia w porównaniu z grupą zdrowych ochotników bez cech atopii [17].

Rozpoznanie astmy sezonowej sprawia często wiele trudności. Składają się na to różne czynniki. Okresowy charakter i często niewielkie nasilenie dolegliwości powodują lekceważenie problemu przez większość pacjentów. Szeroka dostępność doustnych leków przeciwhistaminowych powoduje, że część chorych nie trafia do lekarza w odpowiednim czasie. Chorzy zgłaszają najczęściej kaszel i mniejszą tolerancję wysiłku. Cechy obturacji oskrzeli pojawiają się przeważnie tylko okresowo, stąd też przydatność badania spirometrycznego może okazać się ograniczona. Przyjmowane przez chorych leki, mała dostępność, pracochłonność i częste występowanie nieswoistej nadreaktywności oskrzeli u chorych na ASNN [6] ograniczają możliwości zastosowania testów prowokacyjnych (np. próby prowokacyjnej z histaminą). Bardzo przydatna wydaje się natomiast możliwość wykorzystania nieinwazyjnych metod oceny zapalenia alergicznego, zwłaszcza oznaczanie stężenia tlenku azotu w powietrzu wydychanym. Według większości autorów, wysokie wartości wydychanego NO, związane ze zwiększeniem liczby eozynofików w objętej procesem zapalnym błonie śluzowej oskrzeli, są charakterystyczne dla astmy i ulegają istotnemu obniżeniu pod wpływem leczenia przeciwzapalnego [18,19,20]. Pomiary stężenia NO, oparte na reakcji chemiluminescencji fazy gazowej pomiędzy NO a ozonem znajdują coraz większe zastosowanie w praktyce klinicznej [21,22,13].

Badanie stężenia NO w powietrzu wydychanym u chorych na alergiczny sezonowy nieżyt nosa jest przydatną metodą nieinwazyjnej oceny procesu zapalnego dolnych dróg oddechowych. Pomiary stężenia wydychanego NO mogą być przydatne w monitorowaniu leczenia przeciwzapalnego i ocenie skuteczności immunoterapii swoistej.

Piśmiennictwo

1. Wright AL, Holberg CI, Martinez FD i wsp. Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood. *Pediatrics* 1994; 94: 895-899.
2. Settipane RJ, Hagy GW, Settipane GA. Long-term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis: 23-year follow-up study of college students. *Allergy Proc* 1994; 15: 21-27.
3. Bentley AM, Jacobson MR, Cumberworth V i wsp. Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 877-882.
4. Foresi A, Leone C, Pelucchi A i wsp. Eosinophils, mast cells and basophils in induced sputum from patients with seasonal allergic rhinitis and perennial asthma: relationship to methacholine responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 58-64.
5. Chakir J, Laviolette M, Boutet M i wsp. Lower airways remodeling in nonasthmatic subjects with allergic rhinitis. *Lab Invest* 1996; 75: 735-744.
6. Townley RG, Ryo UY, Kolotkin BM, Kang B. Bronchial sensitivity to methacholine in current and former asthmatic and allergic rhinitis patients and control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56: 429-434.
7. Calhoun WJ, Jarjour NN, Gleich GJ i wsp. Increased airway inflammation with segmental versus aerosol antigen challenge. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1465-1469.
8. Furukawa K, Harrison DG, Saleh D. Expression of nitric oxide synthase in the human nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 847-850.
9. Curran AD. The role of nitric oxide in the development of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 111: 1-4.
10. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 48: 109-141.
11. Barnes PJ. Nitric oxide and airway disease. *Ann Med* 1995; 27: 91-97.

12. Kharitonov SA, Yates D, Robbom RA. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133-135.
13. Ziętkowski Z, Bodzenta-Łukaszyk A. Stężenie tlenku azotu (NO) w powietrzu wydychanym u chorych ze schorzeniami układu oddechowego. *Pol Merk Lek* 2004; 92: 115-118.
14. Frieri M. Nitric oxide in allergic rhinitis and asthma. *Allergy and Asthma Proc* 1998; 19: 349-351.
15. Van den Toorn LM, Prins J, Overbeek S i wsp. Adolescents in clinical remission of atopic asthma have elevated exhaled nitric oxide levels and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 953-957.
16. Gratziau C i wsp. Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *Eur Respir J* 1999; 14: 897-901.
17. Henriksen AH, Sue-Chu M, Lingaas HT i wsp. Exhaled and nasal NO levels in allergic rhinitis: relation to sensitization, pollen season and bronchial hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 1999; 13: 301-306.
18. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA i wsp. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; 53: 91-95.
19. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophilic predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 64-69.
20. Kharitonov SA, Connor BJ, Evans DJ, Barnes P. Allergen-induced late asthmatic response are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1894-1898.
21. Gibson PG, Henry RL, Thomas P. Noninvasive assessment of airway inflammation in children: induced sputum, exhaled nitric oxide and breath condensate. *Eur Respir J* 2000; 16: 1008-1012.
22. Silkoff PE. Noninvasive measurement of airway inflammation using exhaled nitric oxide and induced sputum. Current status and future use. *Clin Chest Med* 2000; 21: 345-349.