



Анализ конденсата выдыхаемого воздуха как метод дифференциальной диагностики патологий дыхательной системы новорожденных

А. С. Кононихин¹, А. Ю. Рындин¹, К. Ю. Федорченко², А. А. Буров¹, О. В. Ионов¹, В. Е. Франкевич¹, И. И. Рюмина¹

¹ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова, г. Москва

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

Цель исследования: сопоставление данных о составе конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) интубированных новорожденных с врожденной пневмонией и левосторонней врожденной диафрагмальной грыжей (ЛВДГ) для определения специфических протеомных и метаболомных профилей заболеваний.

Дизайн: сравнительное исследование.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 24 интубированных новорожденных в возрасте 4–20 дней, у 12 из них была врожденная пневмония и у 12 ЛВДГ. Анализ проб КВВ проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения.

Результаты. В рамках данной работы разработано устройство для сбора КВВ новорожденных, находящихся на искусственной вентиляции легких. Получены протеомы и метаболомы КВВ интубированных младенцев с врожденной пневмонией и ЛВДГ. Мы не обнаружили существенных различий в частоте идентификации и нормализованной суммарной интенсивности пиков группы цитокератинов в рассматриваемых группах. У младенцев с пневмонией идентифицировали расширенную группу иммуноглобулинов (Ig) (Cluster of Ig alpha-1 chain C region, Ig J chain, Cluster of Ig mu chain C region, Ig kappa chain C region). Ig у детей с пневмонией характеризовались более высокой нормализованной суммарной интенсивностью пиков, а уровень нормализованной суммарной интенсивности пиков некоторых других белков в группе пневмонии, напротив, оказался понижен (Dermcidin, Cystatin-A, Calmodulin-like protein 5) по сравнению с таковым в группе ЛВДГ. Интенсивность пиков лейкотриена B4 и 5-гидропероксиэйкозатетраеновой кислоты была значимо выше ($p < 0,05$) в образцах КВВ новорожденных с врожденной пневмонией в сравнении с группой ЛВДГ, а интенсивность пика полиненасыщенного фосфатидилхолина и полиненасыщенного моноглицерида была, напротив, значительно снижена ($p < 0,05$) в образцах КВВ группы врожденной пневмонии по сравнению с группой ЛВДГ.

Заключение. При сопоставлении данных о составе КВВ пациентов с инфекционным и неинфекционным характером заболевания были выявлены отличия на уровне идентифицируемых пептидов и идентифицируемого липидного компонента. Обнаружено сходство белкового профиля у детей с врожденной пневмонией с опубликованными данными по белковому составу КВВ взрослых пациентов с внебольничной пневмонией, что может свидетельствовать о возможности выделения специфического профиля заболевания.

Ключевые слова: конденсат выдыхаемого воздуха, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, новорожденные.

Analysis of Exhaled Breath Condensate As a Method for Differential Diagnosis of Respiratory Pathologies in Newborns

A. S. Kononikhin¹, A. Yu. Ryndin¹, K. Yu. Fedorchenko², A. A. Burov¹, O. V. Ionov¹, V. Ye. Frankevich¹, I. I. Ryumina¹

¹ V. I. Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow

² Lomonosov Moscow State University

Study Objective: To compare the composition of exhaled breath condensate (EBC) in intubated newborns with congenital pneumonia and those with left-sided congenital diaphragmatic hernia (CDH), in order to identify specific proteomic and metabolic profiles of these pathologies.

Study Design: This was a comparative study.

Materials and Methods: The study included 24 intubated newborns, aged four to 20 days, 12 of whom had congenital pneumonia and the other 12 had left-sided CDH. Samples of EBC were analyzed by high-performance liquid chromatography/high-resolution tandem mass spectrometry.

Study Results: As part of this study, a device was designed for the collection of EBC samples from newborns on mechanical ventilation. Proteomes and metabolomes of EBC were identified in intubated infants with congenital pneumonia or left-sided CDH. No significant differences in the frequency of identification of cytokeratin-group peaks or their total normalized intensity were observed between the study groups. The analysis showed that infants with pneumonia had a broader diversity of immunoglobulins (Ig) (Cluster of Ig alpha-1 chain C region, Ig J chain, Cluster of Ig mu chain C region, and Ig kappa chain C region). Compared with the group with left-sided CDH, the group of pneumonia showed a higher total normalized peak intensity of Ig and a lower total normalized peak intensity of some other proteins (dermcidin, cystatin-A, and calmodulin-like protein 5). In EBC samples collected from newborns with congenital pneumonia, the peak intensity of leukotriene B4 and 5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid was significantly higher ($p < 0.05$), and the peak intensity of polyunsaturated phosphatidylcholine and polyunsaturated monoglyceride was, on the contrary, significantly lower ($p < 0.05$) than in EBC samples collected from newborns with left-sided CDH.

Conclusion: A comparison of EBC composition in patients with infectious and non-infectious pathologies revealed a difference in the spectrum of peptides and lipid components studied. The study also showed that the EBC protein profile in babies with congenital pneumonia was consistent with published data on EBC protein composition in adult patients with community-acquired pneumonia. This suggests the possibility of identifying a disease-specific profile.

Keywords: exhaled breath condensate, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, newborns.

Н едоношенные дети составляют значительную долю пациентов отделений интенсивной терапии в перинатальных центрах. Правильное и быстрое определение

диагноза и назначение соответствующего лечения являются задачами, важность которых трудно переоценить. Так, дифференциация респираторных заболеваний инфекционного

Буров Артем Александрович — заведующий по клинической работе отделения хирургии, реанимации и интенсивной терапии новорожденных отдела неонатологии и педиатрии ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: a_burov@oparina4.ru
(Окончание на с. 32.)



и неинфекционного характера позволит принять решение об использовании антибиотиков в схеме терапии [1, 2].

В настоящее время «золотым стандартом» диагностики состояния легких новорожденного ребенка остаются инвазивные методы, такие как микробиологическая оценка лаважа из воздушных путей и/или трахеального аспирата, иммунологическая диагностика с использованием биомаркеров крови [3, 4]. Ввиду трудностей, связанных с проведением таких обследований, особенно у новорожденных, родившихся преждевременно [5], многих специалистов привлекает возможность использования легкодоступных биологических жидкостей и современных омиксных технологий для мониторинга состояния интубированных младенцев. В работе R. Torrazza и соавт. предложены в качестве источника биомаркеров щечные соскобы [6], еще в нескольких исследованиях — моча новорожденных [7–10].

В последние годы анализ летучих и нелетучих компонентов конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) привлекает все больше внимания ученых как новое средство для неинвазивного исследования состояния респираторной системы человека. Многочисленные работы по поиску биомаркеров в КВВ были выполнены для взрослых с различными респираторными патологическими состояниями, такими как астма, ХОБЛ, рак легкого, легочная АГ, идиопатический легочный фиброз, интерстициальные заболевания легких, обструктивное апноэ сна [11–13]. Клиническое применение исследования КВВ в педиатрии было продемонстрировано в работах [14–21]. В исследовании [14] авторы показали, что сбор КВВ у маленьких детей и младенцев (1–30 месяцев) возможен и безопасен, тем не менее проведены лишь отдельные исследования КВВ интубированных новорожденных с ограниченным количеством рассматриваемых соединений [22–24].

В настоящем исследовании нами была разработана система для сбора КВВ интубированных новорожденных. **Цель работы:** сопоставление данных о составе КВВ интубированных новорожденных с врожденной пневмонией и левосторонней врожденной диафрагмальной грыжей (ЛВДГ) для определения специфичных протеомных и метаболомных профилей заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Использовали реактивы и растворители, предназначенные для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), производитель — Sigma-Aldrich (Gillingham, Великобритания). Для ферментативного гидролиза белков применяли модифицированный свиной трипсин (Promega, США).

Доноры конденсата выдыхаемого воздуха. Образцы КВВ собирали с января по сентябрь 2016 г. у новорожденных, находящихся на ИВЛ в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных и хирургии, реанимации и интенсивной терапии новорожденных Научного центра акушерства,

гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова Минздрава России (директор — Сухих Геннадий Тихонович, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор).

Информированное согласие было получено от родителей всех детей. Исследование было одобрено комиссией по исследовательской деятельности Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова в соответствии с Федеральным законом об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации (принят Государственной Думой 1 ноября 2011 г., одобрен Советом Федерации 9 ноября 2011 г.).

В исследовании приняли участие 24 интубированных новорожденных в возрасте 4–20 дней, у 12 из них была врожденная пневмония и у 12 ЛВДГ. Группы новорожденных сравнимы по половозрастному составу (гестационный возраст при рождении: $32,1 \pm 4,3$ недели в группе пневмонии, $35,3 \pm 2,8$ недели в группе ЛВДГ), этнической принадлежности и возрасту матерей ($32,5 \pm 5,7$ года в группе пневмонии, $29,1 \pm 4,2$ года в группе ЛВДГ). Недоношенных среди детей с пневмонией было 50,0%, среди младенцев с ЛВДГ — 16,7% (табл. 1). Здоровые новорожденные не принимали участия в исследовании, поскольку разработанный метод сбора КВВ мог быть применен только к младенцам, находящимся на ИВЛ.

Сбор конденсата выдыхаемого воздуха. Все новорожденные находились на ИВЛ (система AVEA) при постоянном контроле основных жизненных показателей: осуществляли оценку температуры тела, ЭКГ, инвазивное измерение кровяного давления, измерение дыхательного объема и скорости дыхания, определение сатурации артериальной крови кислородом. Данные параметры не изменялись в течение всего времени сбора пробы КВВ. Его производили после клинической стабилизации в течение первого дня после рождения.

Сбор КВВ осуществляли в течение 20 минут, использовали специально разработанный в рамках данного исследования прибор (рис.). Собранный конденсат немедленно переносили в термостойчивые полипропиленовые пробирки (Corning, США) с низкосорбирующей поверхностью и хранили при температуре -85°C не более месяца. Для достижения воспроизводимости результатов протеомного и метаболомного анализов проб, полученных разработанным методом, образцы КВВ трех новорожденных из группы ЛВДГ собирали повторно на второй день после рождения, а еще у одного новорожденного из группы — на второй и третий день после рождения.

Пробоподготовка. Образцы КВВ лиофилизировали и провели ферментативный гидролиз трипсином в соответствии с описанным ранее протоколом [25].

Масс-спектрометрический анализ. Анализ с использованием ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией проводился по ранее описанному протоколу [25] на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., США) и гибридного масс-спектрометра

Ионов Олег Владимирович — к. м. н., заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии новорожденных отдела неонатологии и педиатрии ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: o_ionov@oparina4.ru

Кононихин Алексей Сергеевич — к. физ.-мат. н., научный сотрудник лаборатории протеомики репродукции человека ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: alex.kononikhin@gmail.com

Рындин Андрей Юрьевич — к. м. н., старший научный сотрудник отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных отдела неонатологии и педиатрии ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: a_ryndin@oparina4.ru

Рюмина Ирина Ивановна — д. м. н., профессор, заведующая отделением патологии новорожденных и недоношенных детей ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: i_ryumina@oparina4.ru

Федорченко Кристина Юрьевна — ассистент Международного учебно-научного биотехнологического центра ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова». 119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1. E-mail: kristina.f@biocentr.msu.ru

Франкевич Владимир Евгеньевич — к. физ.-мат. н., заведующий отделом системной биологии и репродукции ФГБУ «НЦАГиП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России. 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: vfrankevich@gmail.com (Окончание. Начало см. на с. 31.)

Демографические и клинические характеристики пациентов, n (%)

Характеристики	Группа врожденной пневмонии (n = 12)	Группа левосторонней врожденной диафрагмальной грыжи (n = 12)
Мужской пол	8 (66,7)	6 (50,0)
Способ родоразрешения:		
• вагинальные роды	0	3 (25,0)
• кесарево сечение	12 (100,0)	9 (75,0)
Менее 7 баллов по шкале Апгар:		
• через 1 мин	8 (66,6)	10 (83,3)
• через 5 мин	3 (25,0)	9 (75,0)
Антибактериальная терапия во время обследования	10 (83,3)	1 (8,3)
Первые роды	7 (58,3)	5 (41,7)
Многоплодная беременность	4 (33,3)	2 (16,7)
Преэклампсия беременных	6 (50,0)	2 (16,7)
Внутриутробное ограничение роста	4 (33,3)	1 (8,3)
Отслойка плаценты	2 (16,7)	1 (8,3)
Пренатальный прием матерью антибиотиков	7 (58,3)	3 (25,0)
Пренатальный прием матерью кортикостероидов	5 (41,7)	2 (16,7)
Тяжелая асфиксия при рождении	2 (16,7)	3 (25,0)
Неонатальные судороги	2 (16,7)	1 (8,3)
Заместительная терапия сурфактантом (поракантом α 120 мг)	5 (41,7)	1 (8,3)

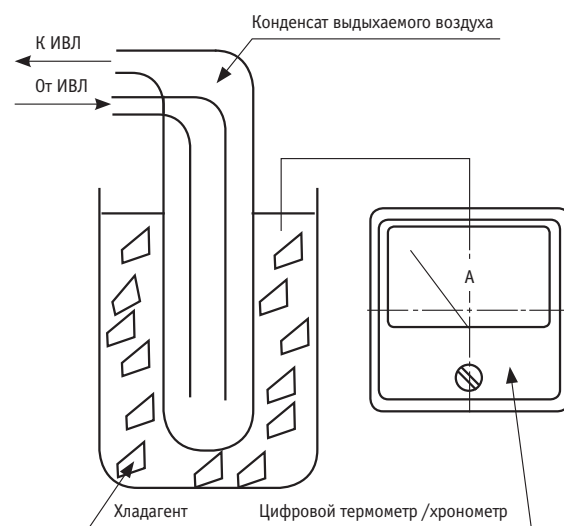
LTQ-FT Ultra (Thermo, Германия) — масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса, совмещенный с линейной квадрупольной ионной ловушкой, использующейся для накопления ионов и измерения спектров столкновительно-индуцированной фрагментации ионов.

Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов использовали для поиска и идентификации белков при помощи программы Mascot, version 2.0.04 (Matrix Science, Великобритания) по базе данных UniProt Knowledgebase (UniProtKB, revision 16.05.2014) [25]. Автоматическую фильтрацию списка белков и пептидов и полуколичественный анализ на основании суммарной интенсивности пиков осуществляли с применением программы Scaffold 4.0, version Scaf-fold-01_07_00 (Proteome Software Inc., США). Считали, что пептид идентифицирован верно, если вероятность его определения была более 95% согласно алгоритму Peptide Prophet. Белок считали идентифицированным при вероятности определения более 99% согласно алгоритму Peptide Prophet и если для него нашли два и более уникальных триптических пептида [26].

Обнаружение метаболитов осуществляли с помощью программы Elements, version 1.2.1 (Proteome Software Inc., США) в диапазоне масс 100–1400 m/z и на всем диапазоне времени удерживания. Порог шума был установлен на 10 000 отн. ед. Для поиска исходной идентификации использовали базу данных метаболомов человека (The Human Metabolome Database) в соответствии с опубликованным ранее протоколом [25]. Идентификацию принимали, если она была определена с ID Score 0.9 или выше.

Статистический анализ полученных результатов. Для поиска статистических различий в протеомном/метаболомном составе КВВ новорожденных использовали U-тест Манна — Уитни с коррекцией Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Рис. Схема установки по сбору конденсата выдыхаемого воздуха с подключением к аппарату искусственной вентиляции легких (ИВЛ)



РЕЗУЛЬТАТЫ

Для реализации заявляемого способа сбора КВВ мы использовали концентрический стеклянный сосуд типового производства (Lenz Laborglasinstrumente, Германия). Стеклянный сосуд подсоединяли с использованием тефлоновых трубок к типовым соединениям ИВЛ. Во время процедуры сбора сосуд помещался в термос с охлаждающей жидкостью (хладагентом), как показано на рисунке. При потоке воздуха в контуре ИВЛ от 1 до 10 л/мин время, необходимое для сбора требуемого количества конденсата (0,5–1 мл), — 12–20 мин.

В таблице 2 описаны условия экспериментов с использованием различных хладагентов: льда с добавлением соли (NaCl), просто льда, этанола (-80 °C).

Протеомный анализ КВВ недоношенных новорожденных, находящихся в отделении интенсивной терапии, выявил 119 различных белков. Инвариантными для всех образцов оказались цитоскелетные кератины I (9, 10, 12, 16, 18, 24) и II (1, 1b, 2, 5) типа. Список некератиновых белков, идентифицированных в пробах обследованных новорожденных, приведен в таблице 3.

В таблице 4 представлены данные по липидным компонентам КВВ участников исследования, значимо различающимся ($p < 0,05$) в составе метаболома больных сравниваемых групп.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе данного исследования было разработано устройство для сбора КВВ новорожденных, находящихся на ИВЛ. Показано (см. табл. 2), что лучше всего использовать этанол, охлажденный до низкой температуры (-80 °C). Наиболее

Таблица 2

Условия экспериментов по забору пробы конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) при использовании различных хладагентов и варьировании времени сбора

№ эксперимента	Объем (мл); время сбора КВВ (мин)	Температура сбора, хладагент
1	0,4; 18	-10 °C; лед + NaCl
2	0,4; 20	-10 °C; лед
3	0,5; 12	-56 °C; этанол -80 °C
4	1,2; 20	-56 °C; этанол -80 °C
5	1,2; 20	-56 °C; этанол -80 °C

подходящим является время сбора 20 мин. За данный период удается собрать пробу объемом более 1 мл, что оптимально для дальнейшего анализа состава пробы КВВ [32].

Таблица 3

Некератиновые белки конденсата выдыхаемого воздуха пациентов

Код в базе UniProt	Название белка	Группа левосторонней врожденной диафрагмальной грыжи	Группа врожденной пневмонии	P
DCD_HUMAN	Dermcidin	1,63	1,11	0,0001
CO4B_HUMAN	Cluster of Complement C4-B	0,50	1,20	< 0,0001
IGHA1_HUMAN	Cluster of Ig alpha-1 chain C region	0,75	1,38	< 0,0001
CYTA_HUMAN	Cystatin-A	1,41	0,09	< 0,0001
CALL5_HUMAN	Calmodulin-like protein 5	1,61	0,00	< 0,0001
RS27A_HUMAN	Cluster of Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	0,71	0,02	0,0004
VTNC_HUMAN	Vitronectin	0,50	0,61	< 0,0001
CASPE_HUMAN	Caspase-14	0,66	0,00	< 0,0001
SHRM3_HUMAN	Protein Shroom3	0,16	0,07	0,0490
PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	0,05	0,15	0,0066
PTGDS_HUMAN	Prostaglandin-H2 D-isomerase	0,07	0,37	< 0,0001
OSTP_HUMAN	Osteopontin	0,21	0,35	0,0002
MUCL1_HUMAN	Mucin-like protein 1	0,18	0,04	0,0390
IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	0,21	0,33	0,0004
FINC_HUMAN	Fibronectin	0,05	0,12	0,0003
SBSN_HUMAN	Suprabasin	0,30	0,00	0,0055
CLUS_HUMAN	Clusterin	0,00	0,20	< 0,0001
S10A7_HUMAN	Protein S100-A7	0,30	0,00	0,0100
ECM1_HUMAN	Extracellular matrix protein 1	0,02	0,17	0,0002
IGJ_HUMAN	Immunoglobulin J chain	0,00	0,11	0,0480
THRB_HUMAN	Prothrombin	0,00	0,11	0,0005
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	0,05	0,11	0,0009
IGHM_HUMAN	Cluster of Ig mu chain C region	0,00	0,22	< 0,0001
PIP_HUMAN	Prolactin-inducible protein	0,23	0,00	0,0390
THIO_HUMAN	Thioredoxin	0,25	0,00	0,0280

Примечание. Средние значения интенсивности по группам даны на основании нормализованной суммарной интенсивности спектров для каждой группы.

Предыдущие исследования показали, что цитоскелетные кератины — это основные белковые компоненты КВВ [12, 27, 32, 33]. В настоящей работе мы не обнаружили существенных различий в частоте идентификации и нормализованной суммарной интенсивности пиков группы цитокератинов в рассматриваемых группах интубированных новорожденных.

Как можно видеть по приведенным данным по идентифицированным некератиновым белкам (см. табл. 3), для группы новорожденных с врожденной пневмонией идентифицировали расширенную группу Ig (Cluster of Ig alpha-1 chain C region, Ig J chain, Cluster of Ig mu chain C region, Ig kappa chain C region). Ig, идентифицированные в группе пневмонии, характеризовались более высокой нормализованной суммарной интенсивностью пиков, в этой группе также идентифицировался комплемент C4 (Cluster of Complement C4-B). Ig в организме человека, как и компоненты комплемента, связаны с иммунным ответом и воспалением, поэтому полученные результаты анализа коррелируют с клинической картиной заболевания.

Уровень нормализованной суммарной интенсивности пиков некоторых других белков в группе пневмонии, напротив, оказался понижен (Dermcidin, Cystatin-A, Calmodulin-like protein 5) по сравнению с таковым в группе ЛВДГ. Примечательно, что результаты данного исследования совпали с результатами анализа КВВ взрослых пациентов с диагнозом внебольничной пневмонии [12]. Так, показано, что при сравнении групп здоровых людей и больных ХОБЛ дермцидин являлся практически инвариантным (частота встречаемости в пробах — 96% и 94% соответственно), а у пациентов с пневмонией частота идентификаций этого белка резко упала — до 60%. Цистатин А, характерный для КВВ большинства обследованных доноров, включая здоровых некурящих и курильщиков, отсутствовал в пробах больных

пневмонией, взамен этого «нормального» цистатина появились два других: цистатин В и цистатин М.

Пики эйкозаноидов (простагландинов, лейкотриенов, липоксинов) присутствовали в масс-спектрах более 60% образцов КВВ. Эти вещества относятся к окисленным производным полиненасыщенных жирных кислот и функционируют главным образом как провоспалительные медиаторы и бронхоконстрикторы [34].

Интенсивность пиков лейкотриена В4 и 5-гидроперокси-эйкозатетраеновой кислоты была значимо выше ($p < 0,05$) в образцах КВВ новорожденных с врожденной пневмонией в сравнении с группой ЛВДГ (см. табл. 4). Интенсивность пика полиненасыщенного фосфатидилхолина и полиненасыщенного моноглицерида была, напротив, значительно снижена ($p < 0,05$) в образцах КВВ группы врожденной пневмонии по сравнению с группой ЛВДГ. S. Carraro и соавт. [35] предложили использовать полиненасыщенный фосфатидилхолин как маркер бронхолегочной дисплазии, при которой нарушения структуры альвеоли легочных сосудов имеют много общего с таковыми при ЛВДГ [36]. Свободные моноглицериды попадают в КВВ в основном как продукты гидролиза лизоглицерофосфолипидов и триглицеридов. Как показали проведенные исследования, уровни лизоглицерофосфолипидов повышены при многих легочных патологиях, включая бронхолегочную дисплазию [35, 37].

На основании полученных данных о белковом и липидном составе КВВ новорожденных с врожденной пневмонией и ЛВДГ и их сопоставления с результатами ранее опубликованных работ можно заключить, что анализ КВВ является информативным методом оценки состояния респираторной системы и позволяет дифференцировать группы пациентов с инфекционным и неинфекционным респираторным заболеванием. Однако эти выводы требуют подтверждения в ходе дополнительных исследований более многочисленной группы пациентов.

Таблица 4

Патофизиологические/молекулярные/клинические данные по липидным компонентам конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) новорожденных

Компонент КВВ	Патофизиологические и молекулярные данные	Потенциальная клиническая значимость для диагностики
Лейкотриен В4 (LTB4), 5-гидропероксиэйкозатетраеновая кислота (5-HPETE)	5-HPETE является интермедиатом при образовании лейкотриена LTB4 из арахидоновой кислоты во время окисления полиненасыщенных жирных кислот. Основная функция — провоспалительные медиаторы и бронхоконстрикторы	LTB4 является кандидатом на роль маркера тяжелых форм астмы у детей [27]
Фосфатидилхолин PC 22:1	Фосфатидилхолины — ключевые компоненты липидного бислоя клеток и легочного сурфактанта, а также вовлечены в процессы метаболизма и передачи сигналов	Ненасыщенные фосфатидилхолины PC 22:1 были предложены в качестве маркеров бронхолегочной дисплазии [28]
Моноглицериды MG 18:2	Продукт гидролиза лизоглицерофосфолипидов и триглицеридов. Маркеры окислительного стресса	Показано, что количество лизоглицерофосфолипидов растет при многих легочных патологиях, включая бронхолегочную дисплазию [28, 29]
9-гидроперокси-10,12-октадекадиеновая кислота (9-HPODE), 13-гидроперокси-9,11-октадекадиеновая кислота (13-HPODE)	Первичный продукт перекисного окисления линолевой кислоты	Во многих исследованиях наблюдали связь воспаления и 9-HPODE и 13-HPODE при различных заболеваниях, в частности атеросклерозе и ревматоидном артрите [30]
4-гидроперокси-2-нонаналь (HPNE)	HPNE образуется из 13-HPODE и метаболизируется до высокореакционных α -, β -ненасыщенных альдегидов. HPNE является альдегидом, который ковалентно модифицирует белки и дезоксирибонуклеиновую кислоту	HPNE может вносить вклад в модификацию биомолекул и повреждение ткани в условиях окислительного стресса [31]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ


В данном исследовании нами были получены протеомы и метаболомы конденсатов выдыхаемого воздуха (КВВ) интубированных новорожденных с врожденной пневмонией и левосторонней врожденной диафрагмальной грыжей. При сопоставлении данных о составе КВВ пациентов с инфекционным и неинфекционным характером заболевания были выявлены существенные отличия на уровне идентифицируемых пептидов и липидного компонента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stoll B. J., Hansen N. I., Bell E. F., Shankaran S., Laptook A. R., Walsh M. C. et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2010; 126(3): 443–56.
2. Jobe A. H., Ikegami M. Prevention of bronchopulmonary dysplasia. *Curr. Opin. Pediatr*. 2001; 13(2): 124–9.
3. Harwood D. T., Darlow B. A., Cheah F. C., McNeill N., Graham P., Winterbourn C. C. Biomarkers of neutrophil-mediated glutathione and protein oxidation in tracheal aspirates from preterm infants: association with bacterial infection. *Pediatr. Res*. 2011; 69(1): 28–33.
4. Schneibel K. R., Fitzpatrick A. M., Ping X. D., Brown L. A., Gauthier T. W. Inflammatory mediator patterns in tracheal aspirate and their association with bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight neonates. *J. Perinatol*. 2013; 33(5): 383–7.
5. Marraro G. A., Chen C., Piga M. A., Qian Y., Spada C., Genovese U. Acute respiratory distress syndrome in the pediatric age: an update on advanced treatment. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2014; 16(5): 437–47.
6. Murgas Torrazza R., Li N., Young C., Kobeissy F., Chow M., Chen S. et al. Pilot study using proteomics to identify predictive biomarkers of necrotizing enterocolitis from buccal swabs in very low birth weight infants. *Neonatology*. 2013; 104(3): 234–42.
7. Starodubtseva N. L., Kononikhin A. S., Bugrova A. E., Chagovets V., Indeykina M., Krokhnina K. N. et al. Investigation of urine proteome of preterm newborns with respiratory pathologies. *J. Proteomics*. 2016; 149: 31–7.
8. Sylvester K. G., Ling X. F. B., Liu G. Y. G., Kastenbergs Z. J., Ji J., Hu Z. et al. Urine protein biomarkers for the diagnosis and prognosis of necrotizing enterocolitis in infants. *J. Pediatr*. 2014; 164(3): 607–12.e1–7.
9. Decramer S., Zurbig P., Wittke S., Mischak H., Bascands J. L., Schanstra J. P. Identification of urinary biomarkers by proteomics in newborns: use in obstructive nephropathy. *Contrib. Nephrol*. 2008; 160: 127–41.
10. Lacroix C., Caubet C., Gonzalez-de-Peredo A., Breuil B., Bouyssié D., Stella A. et al. Label-free quantitative urinary proteomics identifies the arginase pathway as a new player in congenital obstructive nephropathy. *Mol. Cell Proteomics*. 2014. 13(12): 3421–34.
11. Kuban P., Foret F. Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review. *Anal. Chim. Acta*. 2013; 805: 1–18.
12. Kononikhin A. S., Fedorchenko K. Y., Ryabokon A. M., Starodubtseva N. L., Popov I. A., Zavalova M. G. et al. Proteomic analysis of exhaled breath condensate for diagnostics of respiratory system diseases. *Biochem. (Moscov)*. Suppl. Series B: Biomed. Chem. 2016; 10(3): 230–4.
13. Konstantinidi E. M., Lappas A. S., Tzortzi A. S., Behrakis P. K. Exhaled breath condensate: technical and diagnostic aspects. *Sci. World J*. 2015; 2015: 435160.
14. Moeller A., Franklin P., Hall G. L., Horak F. Jr., Wildhaber J. H., Stick S. M. Measuring exhaled breath condensates in infants. *Pediatr. Pulmonol*. 2006; 41(2): 184–7.
15. Filippone M., Bonetto G., Corradi M., Frigo A. C., Baraldi E. Evidence of unexpected oxidative stress in airways of adolescents born very preterm. *Eur. Respir. J*. 2012; 40(5): 1253–9.
16. Fanos V., Antonucci R., Barberini L., Noto A., Atzori L. Clinical application of metabolomics in neonatology. *J. Mater. Fetal Neonatal Med*. 2012; 25(suppl.1): S104–9.
17. Fanos V., Barberini L., Antonucci R., Atzori L. Metabolomics in neonatology and pediatrics. *Clin. Biochem*. 2011; 44(7): 452–4.
18. Carraro S., Folesani G., Corradi M., Zanconato S., Gaston B., Baraldi E. Acid-base equilibrium in exhaled breath condensate of allergic asthmatic children. *Allergy*. 2005; 60(4): 476–81.
19. Brunetti L., Francavilla R., Tesse R., Strippoli A., Polimeno L., Loforese A. et al. Exhaled breath condensate pH measurement in children with asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol*. 2006; 17(6): 422–7.

При дальнейших исследованиях полученные результаты могут помочь дифференцировать профили заболеваний респираторного тракта инфекционной и неинфекционной природы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 15-38-70039 «мол_а_мос».

20. Carraro S., Giordano G., Reniero F., Carpi D., Stocchero M., Sterk P. J. et al. Asthma severity in childhood and metabolomic profiling of breath condensate. *Allergy*. 2013; 68(1): 110–17.
21. Montuschi P., Paris D., Melck D., Lucidi V., Ciabattini G., Raia V. et al. NMR spectroscopy metabolomic profiling of exhaled breath condensate in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Thorax*. 2012; 67(30): 222–8.
22. Cheah F. C., Darlow B. A., Winterbourn C. C. Association of hydrogen peroxide in exhaled breath condensates from infants with respiratory distress syndrome with the development of chronic lung disease. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed*. 2006; 91(2): F155.
23. Rosso M. I., Roark S., Taylor E., Ping X., Ward J. M., Roche K. et al. Exhaled breath condensate in intubated neonates — a window into the lung's glutathione status. *Respir. Res*. 2014; 15: 1.
24. Hitka P., Cerný M., Vizek M., Wilhelm J., Zaban P. Assessment of exhaled gases in ventilated preterm infants. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov*. 2004; 53(5): 561–4.
25. Kononikhin A. S., Ryndin A. Y., Starodubtseva N. L., Chagovets V. V., Burov A. A., Bugrova A. E. et al. Studying the proteomic composition of expired air condensate in newborns on breathing support. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2016; 160(6): P. 861–3.
26. Debley J. S., Cochrane E. S., Redding G. J., Carter E. R. Lung function and biomarkers of airway inflammation during and after hospitalization for acute exacerbations of childhood asthma associated with viral respiratory symptoms. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 2012; 109(2): 114–20.
27. Hoffmann H. J., Tabaksblat L. M., Enghild J. J., Dahl R. Human skin keratins are the major proteins in exhaled breath condensate. *Eur. Respir. J*. 2008; 31(2): 380–4.
28. Thevenot E. A., Roux A., Xu Y., Ezan E., Junot C. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *J. Proteome Res*. 2015; 14(8): 3322–35.
29. Samitas K., Zervas E., Vittorakis S., Semitekolou M., Alissafi T., Bossios A. et al. Osteopontin expression and relation to disease severity in human asthma. *Eur. Respir. J*. 2011; 37(2): 331–41.
30. Hahn B. H., Grossman J., Ansell B. J., Skaggs B. J., McMahon M. Altered lipoprotein metabolism in chronic inflammatory states: proinflammatory high-density lipoprotein and accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther*. 2008; 10(4): 213.
31. McAuley J. L., Linden S. K., Png C. W., King R. M., Pennington H. L., Gendler S. J. et al. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J. Clin. Invest*. 2007; 117(8): 2313–24.
32. Kurova V. S., Anev E. C., Kononikhin A. S., Fedorchenko K. Y., Popov I. A., Kalupov T. L. et al. Proteomics of exhaled breath: methodological nuances and pitfalls. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2009; 47(6): 706–12.
33. Kurova V. S., Kononikhin A. S., Sakharov D. A., Popov I. A., Larina I. M., Tonevitskii A. G. et al. Exogenous proteins in the human exhaled breath condensate. *Bioorg. Khim*. 2011; 37(1): 55–60.
34. Khanapure S. P., Garvey D. S., Janero D. R., Letts L. G. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem*. 2007; 7(3): 311–40.
35. Carraro S., Giordano G., Pirillo P., Maretto M., Reniero F., Cogo P. E. et al. Airway metabolic anomalies in adolescents with bronchopulmonary dysplasia: new insights from the metabolomic approach. *J. Pediatr*. 2015; 166(2): 234–39(e231).
36. Silva D. M., Nardiello C., Pozarska A., Morty R. E. Recent advances in the mechanisms of lung alveolarization and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol*. 2015; 309(11): L1239–72.
37. Wheelock C. E., Goss V. M., Balgoma D., Nicholas B., Brandsma J., Skipp P. J. et al. Application of omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *Eur. Respir. J*. 2013; 42(3): 802–25. 

Библиографическая ссылка:

Кононихин А. С., Рындин А. Ю., Федорченко К. Ю., Буров А. А., Ионов О. В., Франкевич В. Е., Рюмина И. И. Анализ конденсата выдыхаемого воздуха как метод дифференциальной диагностики патологий дыхательной системы новорожденных // Доктор.Ру. 2017. № 3 (132). С. 31–36.

Citation format for this article:

Kononikhin A. S., Ryndin A. Yu., Fedorchenko K. Yu., Burov A. A., Ionov O. V., Frankevich V. Ye., Rymina I. I. Analysis of Exhaled Breath Condensate As a Method for Differential Diagnosis of Respiratory Pathologies in Newborns. *Doctor.Ru*. 2017; 3(132): 31–36.