

Э.Х.Анаев, Т.Н.Анохина, М.Э.Кушаева, А.Г.Чучалин

Неинвазивные биомаркеры хронической обструктивной болезни легких

ФГБУ "Научно-исследовательский институт пульмонологии" ФМБА России: 105077, Москва, ул. 11-я Парковая, 32, корп. 4

E.Kh.Anaev, T.N.Anokhina, M.E.Kushaeva, A.G.Chuchalin

Non-invasive biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, diagnosis, biomarkers, exhaled breath condensate, metabolomics, proteomics.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, диагностика, биомаркеры, конденсат выдыхаемого воздуха, метаболомика, протеомика.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется воспалением дыхательных путей и прогрессирующим ограничением воздушного потока [1, 2]. Использование биомаркеров при ХОБЛ может помочь в определении различных фенотипов заболевания, долгосрочных прогнозов или ответа на терапевтические воздействия [3, 4]. До сих пор специфические биомаркеры ХОБЛ не определены [5]. К предполагаемым биомаркерам ХОБЛ относят нейтрофилез мокроты, который указывает на ухудшение функции легких [2], а также эозинофилию мокроты, которая является предиктором ответа на лечение глюкокортикостероидами (ГКС) [6, 7]. Другие определяемые биомаркеры могут помочь при диагностике и мониторинге обострений ХОБЛ [4, 5, 8, 9].

В последние годы отмечается возрастающий интерес к исследованию легких при помощи неинвазивных методов, включая измерение биомаркеров в выдыхаемом воздухе и конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) [10–12]. Эти методы безопасны, не влияют на функцию легких и уровень выдыхаемых медиаторов [10], что делает их одними из эпидемиологических методов исследования патологических процессов (окислительного стресса и воспаления) при изучении болезней органов дыхания [13–16].

КВВ состоит из комплекса биомаркеров с разными химическими свойствами [3, 10, 13, 15, 17]. Содержание многих маркеров в КВВ находится на границе определяемых значений, тем самым провоцируя большую вариабельность данных [10, 12]. Иммунологические исследования (определение цитокинов и других маркеров) требуют доказательных методов из-за низкого содержания белка и разного химического состава.

Иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA) является распространенным методом для измерения медиаторов воспаления в КВВ [5, 18, 19]. Специфичность метода ELISA для лейкотриена В₄ (ЛТВ₄) и 8-изопростана была подтверждена при помощи обратнотвержденной высокоэффективной жидкостной

хроматографии (ВЭЖХ) [3]. Для улучшения репродуктивности методов требуется концентрирование образцов и разработка более чувствительных технологий [10, 20].

Использование масс-спектрометрии (МС) может обеспечить более точный количественный анализ присутствующих в КВВ соединений. Сочетание газовой или жидкостной хроматографии и МС предлагает высокую чувствительность для анализа КВВ [20, 21].

В последние годы для определения профиля низкомолекулярных метаболитов в КВВ используется метаболомный анализ, основанный на ядерно-магнитном резонансе (ЯМР) высокого разрешения или ВЭЖХ и МС [22, 23]. Было показано, что метаболомный ЯМР-анализ КВВ позволяет с высокой точностью отличать больных ХОБЛ от здоровых субъектов [24]. Этот метод является многообещающим для разработки гипотез по определению новых метаболитических путей, которые помогут в идентификации еще не установленных биомаркеров ХОБЛ.

Интенсивно развивающимися направлениями являются постгеномные технологии. Такие диагностические подходы, как геномика, протеомика и метаболомика позволяют проводить оценку профилей биомаркеров и формировать "отпечаток" заболевания [25]. Подобный подход может быть применен не только к сыворотке крови [26] или бронхоальвеолярной лаважной жидкости [27, 28], но и к выдыхаемому воздуху и КВВ (брифтеомика).

У больных ХОБЛ анализ выдыхаемого воздуха и КВВ проводят с целью исследования патологических процессов в дыхательных путях посредством изучения изменений уровня медиаторов, а также использования их значений в качестве биомаркеров ХОБЛ.

Биомаркеры в выдыхаемом воздухе

Содержание оксида азота (NO) и монооксида углерода (CO) в выдыхаемом воздухе используют в качестве неинвазивных биомаркеров воспаления и окислительного стресса при ХОБЛ. Средний уровень CO

в выдыхаемом воздухе у курящих больных ХОБЛ был значимо выше, чем у экс-курильщиков с ХОБЛ и здоровых некурящих лиц из группы контроля [29]. Выдыхаемый NO у курящих и экс-курильщиков с ХОБЛ был выше, чем у здоровых людей [30]. Не выявлено корреляции между содержанием CO и NO в выдыхаемом воздухе, а также между уровнем CO и легочной функцией при ХОБЛ [29].

Определение выдыхаемого NO широко используется для оценки эффективности ингаляционных ГКС (иГКС) у пациентов с бронхиальной астмой (БА), а также у экс-курильщиков с ХОБЛ [31]. Концентрация CO и NO в выдыхаемом воздухе у больных ХОБЛ, не получающих ГКС, была достоверно выше, чем у здоровых людей [29, 30].

Содержание этана (продукта перекисного окисления липидов и показатель окислительного стресса) указывает на дисбаланс в системе "оксиданты—антиоксиданты" при ХОБЛ. Концентрация этана обратно коррелировала со значением объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ₁). У пациентов, получавших стероиды, уровень этана был ниже, а содержание CO и NO значимо не различались. Таким образом, содержание этана в выдыхаемом воздухе повышено и коррелирует с ОФВ₁, значимо ниже у больных ХОБЛ, получающих стероиды, и может быть использовано при оценке и мониторинге окислительного стресса при ХОБЛ [32].

Анализ различных летучих органических соединений (ЛОС) выдыхаемого воздуха и КВВ вызывает интерес у многих исследователей. Впервые *A. Garrod* (1908) предположил, что патологические состояния в организме человека могут быть отражены в характерных изменениях профилей ЛОС [33]. В последние годы для анализа выдыхаемого воздуха используется прибор *Electronic nose (E-nose)*, который проводит онлайн анализ ЛОС с помощью 32 нанодатчиков. С по-

мощью этого метода выявлены различия профилей ЛОС у пациентов с патологией легких и у здоровых людей. Использование *E-nose* позволяет отличить экс-курильщиков с ХОБЛ от экс-курильщиков с раком легкого [34]. Имеются исследования по использованию *E-nose* в дифференциальной диагностике ХОБЛ и БА [22]. Однако *E-nose* не позволяет проводить анализ отдельных компонентов смесей ЛОС [22, 34].

Биомаркеры КВВ

Результаты исследований специфических биомаркеров КВВ при фенотипировании ХОБЛ, мониторинге обострения и оценке эффективности терапевтических вмешательств приведены в табл. 1.

Уровень pH

Гомеостаз дыхательных путей зависит от баланса различных буферных систем, продукции и высвобождения кислот и оснований в дыхательные пути. Предполагают, что кислотность дыхательных путей и ее регуляция вовлечены в патогенез ХОБЛ. Потенциальный механизм заключается в том, что протоны вызывают высвобождение тахикининов, ведущих к бронхоспазму и воспалению дыхательных путей.

В отличие от других медиаторов КВВ, уровень pH КВВ у больных ХОБЛ может варьироваться в широких пределах [35, 37, 38]. Более высокая вариабельность pH КВВ у больных ХОБЛ по сравнению со здоровыми субъектами, вероятнее всего, связана с различным уровнем pH в дыхательных путях [35]. Механизмы, которые способствуют окислению дыхательных путей и его вариабельности при ХОБЛ, не ясны.

Было зарегистрировано снижение показателей pH при обострении и ремиссии ХОБЛ [36–38]. У больных с обострением ХОБЛ была обнаружена прямая

Таблица 1
Данные исследований по анализу биомаркеров в КВВ у больных ХОБЛ

Биомаркеры	ХОБЛ (ремиссия)	ХОБЛ (обострение)	Эффект курения	Эффект лечения
pH	↓ [35, 36]	↓ [35–38]		иГКС ↔ [38] Антибиотики ↑ [36]
Метаболиты NO	↓ NO _x [17] ↑ Нитриты [39] ↑ S-нитрозотиолы [39]	↑ NO _x [30]	↑ NO _x [10] ↔ NO _x [17]	иГКС ↔ NO _x [17] иГКС ↓ NO _x [30]
Простаноиды	↑ ПГЕ2, ПГФ2α [19]	↔ ПГЕ2 [40]		Неселективные ингибиторы ЦОГ ↓ ПГЕ2 [41] иГКС ↔ ПГЕ2 [19]
Лейкотриены	↑ ЛТВ4 [6, 19, 42]	↑ ЛТВ4 [40, 42] ↑ ЛТС4, ЛТД4, ЛТЕ4 [40]		Неселективные ингибиторы ЦОГ ↑ ЛТВ4 [41] Антибиотики ↓ ЛТВ4 [42, 43] иГКС ↔ ЛТВ4 [19]
8-Изопростан	↑ [16, 18, 44]	↑ [16, 40, 42, 44]	↔ [18]	Антибиотики ↓ [42] иГКС ↔ [3]
Пероксид водорода	↑ [16, 36, 45]	↑ [36, 45–47]	↑ [18] ↔ [45]	иГКС ↔ [31], ↓ [47] N-ацетилцистеин ↓ [48]
Цитокины	↑ IL-1β, 12; TNF-α [49, 50]	↑ IL-6, 8, 10, 12, 1β; TNF-α [49, 51–53]	↔ IL-1β; TNF-α [15]	

Примечание: ПГЕ2, ПГФ2α – простагландины; ЛТС4, ЛТД4, ЛТЕ4 – лейкотриены; IL – интерлейкины; ↑ – повышение, ↓ – понижение, ↔ – без изменений, ЦОГ – циклооксигеназа. TNF-α – фактор некроза опухоли-α.

связь между уровнем рН КВВ и показателями легочной функции – ОФВ₁ и отношением показателей ОФВ₁ и форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) [36], хотя в других исследованиях корреляция ОФВ₁ с уровнем рН не подтверждена [35, 37]. *Kostikas K. et al.* обнаружили, что уровень рН КВВ коррелирует с эозинофильным и нейтрофильным воспалением дыхательных путей и легочной функцией [38].

Пероксид водорода

Пероксид водорода продуцируется различными клетками дыхательных путей, включая нейтрофилы, эозинофилы, макрофаги и эпителиальные клетки, путем реакции супероксид-аниона O₂⁻ при воздействии супероксиддисмутазы [10].

Концентрация пероксида водорода в КВВ повышалась у здоровых курильщиков и больных ХОБЛ, но различия между группами были недостоверными [16, 45]. У пациентов с обострением ХОБЛ обнаружены более высокие показатели, чем при стабильном течении заболевания [31, 36, 46, 47]. Длительное лечение больных ХОБЛ муколитическим антиоксидантом N-ацетилцистеином вызывало снижение концентрации пероксида водорода в КВВ [48]. Также было зарегистрировано, что ингаляции беклометазона и флютиказона пропионата снижают уровень пероксида водорода в КВВ через 4 нед. лечения, в то время как содержание пероксида водорода в КВВ не изменилось после 2 нед. лечения беклометазоном по сравнению с плацебо в перекрестном исследовании у больных ХОБЛ [31, 47].

Обнаружены корреляции между уровнем пероксида водорода в КВВ и значением ОФВ₁, числом нейтрофилов в мокроте и тяжестью одышки, указывающие на то, что этот медиатор отражает активность воспалительного процесса [10]. Следовательно, измерение пероксида водорода в КВВ можно использовать для оценки эффективности лечения при ХОБЛ.

Оксид азота и его продукты

Оксид азота (NO) – высокореактивный свободный радикал, конечными стабильными продуктами которого являются NO₂⁻ и NO₃⁻ (NO_x). При окислительном стрессе в результате реакции между NO и супероксид-анионом в дыхательных путях образуется пероксинитрит – мощный оксидант. Последний, в свою очередь, реагирует с тирозином, образуя стабильный продукт нитротирозин, который может быть определен при помощи специфических антител. Метаболиты NO можно определить в жидкости, покрывающей альвеолярный эпителиальный слой (*alveolar lining fluid* – ALF) респираторного тракта [3, 30].

Газообразный NO взаимодействует с ALF, приводя к повышению в ней содержания NO_x [3]. Более высокий уровень NO₂⁻ и NO₃⁻ обнаружен в КВВ у больных ХОБЛ по сравнению с курящими и некурящими субъектами. Была обнаружена прямая взаимосвязь между уровнем выдыхаемого NO и концентрацией NO_x в КВВ у больных ХОБЛ [30]. Это

указывает на высокий нитративный стресс в дыхательных путях у пациентов с ХОБЛ. *Gessner C. et al.* выявили сильную взаимосвязь между концентрацией NO₃⁻ в КВВ и гиперинфляцией легких при ХОБЛ [17]. При бронхитическом типе ХОБЛ, где продукция слизи может привести к уменьшению уровня выдыхаемого NO, измерение NO_x в КВВ может иметь преимущества [3, 39]. Потенциал использования анализа NO_x в КВВ в качестве биомаркера оценки эффективности лечения должен быть дополнительно изучен при ХОБЛ, в т. ч. у экс-курильщиков.

Нитрозотиолы (RS-NOs) формируются при взаимодействии NO или NO₂⁻ с глутатионом или другими тиолсодержащими соединениями. Было обнаружено достоверное повышение концентрации нитрозотиолов в КВВ у курящих больных по сравнению с некурящими. Также был продемонстрирован достоверно высокий уровень нитрозотиолов в КВВ у экс-курильщиков с ХОБЛ по сравнению со здоровыми некурящими субъектами [39]. В настоящее время нет исследований по определению нитротирозина в КВВ при ХОБЛ.

Метаболиты арахидоновой кислоты

Арахидоновая кислота, высвобождаемая из клеточных мембран посредством фосфолипазы A₂, превращается в простагландиновые эндопероксиды при помощи ЦОГ. Эндопероксиды затем превращаются в простагландины, простаглицлин и тромбоксан A₂ (TxA₂) [10]. TxA₂ быстро превращается в химически стабильный TxV₂, но биологически неактивный метаболит (в дальнейшем TxV₂ подвергается β-окислению, в результате образуется 2, 3-динор-TxV₂). Поэтому синтез тромбксана в биологических тканях можно мониторировать с помощью измерения TxV₂.

Простагландины

Не было обнаружено значимой разницы содержания выдыхаемых ПГЕ₂, ПГD₂ и TxV₂ между здоровыми и больными ХОБЛ [40], тогда как концентрация ПГЕ₂ в КВВ у больных ХОБЛ была повышена [19]. Эти наблюдения демонстрируют, что профиль простагландинов в КВВ при ХОБЛ может различаться.

Было выявлено, что у больных ХОБЛ ибупрофен, в отличие от рофекоксиба (селективного ингибитора ЦОГ-2), значительно снижает содержание ПГЕ₂ в КВВ по сравнению с плацебо. Это показывает, что с помощью данного биомаркера можно с высокой чувствительностью различать селективное и неселективное подавление ЦОГ у больных ХОБЛ [41]. Для правильной оценки возможностей определения ПГЕ₂ в КВВ в качестве биомаркера эффективности терапии ингибиторами ЦОГ необходимы дополнительные исследования.

Лейкотриены

ЛТВ₄ – продукт арахидоновой кислоты по 5-липоксигеназному пути – потенциальный хемоаттрактант нейтрофилов, который играет важную роль в патогенезе ХОБЛ. Цистеиновые лейкотриены (ЛТС₄, ЛТD₄, ЛТЕ₄) высвобождаются из воспалительных

клеток, частично — из эозинофилов и тучных клеток и играют важную роль при воспалении дыхательных путей при БА.

Повышение уровня ЛТВ4 в КВВ было продемонстрировано у больных с обострением и со стабильным течением ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками [19, 40, 42, 43]. Это предполагает, что анализ ЛТВ4 в КВВ может быть использован для диагностики ХОБЛ.

Не было различий в содержании ЛТВ4 в КВВ в группах больных ХОБЛ, получающих и не получающих ГКС, что не может окончательно исключить их влияние на уровень ЛТВ4. Концентрация ЛТВ4 в КВВ была повышена у больных ХОБЛ в стадии ремиссии, в дальнейшем повышалась при обострении заболевания и снижалась после антибактериальной терапии [42, 43]. Это предполагает, что ЛТВ4 является индикатором тяжести воспаления в дыхательных путях. Концентрация ЛТВ4 в КВВ у больных ХОБЛ коррелирует с нейтрофилизом мокроты и может быть полезным маркером степени нейтрофильного воспаления [40].

8-изопростан

8-изопростан — стабильный простагландиноподобный продукт, который синтезируется из арахидоновой кислоты под действием активных форм кислорода, поэтому позиционируется как маркер оксидативной активности и окислительного стресса. Концентрация 8-изопростана в КВВ была повышена у больных с ремиссией ХОБЛ по сравнению со здоровыми некурящими субъектами [16, 18]. Также уровень 8-изопростана в КВВ был повышен у здоровых курильщиков [18] и пациентов с обострением ХОБЛ [16, 40, 42]. После лечения его концентрация снижалась.

Не наблюдалось корреляций между уровнем 8-изопростана и значением ОФВ₁, стажем курения, клеточным составом мокроты или тяжестью одышки у больных ХОБЛ [16, 18]. Однако *F.W.Ko et al.* обнаружили значимо высокие концентрации 8-изопростана в КВВ у больных с тяжелой стадией ХОБЛ по сравнению с легким и среднетяжелым течением заболевания [44].

Среднелетучие метаболиты

Среди постгеномных технологий метаболомика наиболее приближена к медицинской диагностике, так как профиль метаболитов является наиболее информативной характеристикой фенотипа. Это позволяет проводить поиск новых биомаркеров различных заболеваний среди метаболитов, которые содержатся в различных биологических жидкостях. КВВ — органоспецифическая жидкость, состав которой может отражать патологические процессы и метаболические изменения в легких.

Среднелетучие органические соединения (СЛОС) — вещества с температурой кипения 200–400 °С. СЛОС, сконцентрированные в КВВ, лучше характеризуют состав эндогенных метаболитов, чем анализ ЛОС в выдыхаемом воздухе [21].

С целью выявления новых биомаркеров окислительного стресса и воспаления в дыхательных путях проведен анализ среднелетучих метаболитов в КВВ у больных ХОБЛ и БА.

В образцах КВВ больных ХОБЛ, БА и здоровых лиц обнаружено в ультранизкой концентрации (0,1–10 ppb) > 100 СЛОС, из которых по библиотеке масс-спектров NIST-2005 было идентифицировано 33 экзогенных и эндогенных среднелетучих метаболита, относящихся к различным классам органических химических соединений: насыщенные жирные кислоты (НЖК), кетоны, эфиры, фенолы, спирты, альдегиды, алкалоиды и углеводороды. Большая часть из идентифицированных СЛОС представлена в интернет-базе данных метаболома человека (*Human Metabolome Database* — HMDB). Эти метаболиты определяют в крови, моче, цереброспинальной жидкости, но информации по определению их в КВВ нет. Все НЖК, кроме изокапроновой кислоты, были найдены в HMDB и являются эндогенными метаболитами, за исключением пентадекановой кислоты, которая относится к экзогенным. Некоторые из идентифицированных в КВВ среднелетучих метаболитов являются производными НЖК (деканол, деканаль, нонаналь, циклододекан) и, вероятно, принимают участие в их метаболизме в легких.

Было выявлено, что у больных ХОБЛ содержание фенола в КВВ значимо ниже, а уровень хинолина достоверно выше, чем у здоровых лиц в группе контроля. Обнаружены различия качественного и количественного состава среднелетучих метаболитов в КВВ при ХОБЛ по сравнению с БА: повышено содержание тексанола, реже встречаются ундециловая кислота и 2-феноксэтанол, чаще — деканол, что обусловлено разными механизмами воспалительного процесса и выраженностью окислительного стресса в дыхательных путях при этих заболеваниях.

Корреляционный анализ выявил прямые взаимосвязи между экспрессией НЖК в КВВ и клиническими симптомами ХОБЛ (суммарный балл шкалы симптомов по *Paggiaro*, 1998; одышка по шкале MRC), физикальными данными (частота дыхательных движений — ЧДД, частота сердечных сокращений — ЧСС), показателями газообмена (pCO₂ и HCO₃⁻ артериальной крови), систолическим давлением в легочной артерии (СДЛА), и обратные корреляции с сатурацией кислородом (SpO₂) и показателями легочной функции (табл. 2) [23].

Также наблюдалась сильная прямая связь между индексом курения и содержанием никотина в КВВ больных ХОБЛ, что свидетельствует о значимом влиянии интенсивности табакокурения на депозицию никотина в дыхательных путях. Полученные результаты указывают на возможное участие среднелетучих метаболитов в патогенезе ХОБЛ.

Таким образом, в КВВ больных ХОБЛ были выявлены среднелетучие метаболиты, которые могут рассматриваться в качестве новых биомаркеров этого заболевания. Дальнейшие исследования в этой области создают предпосылки для использования метаболомного анализа КВВ при мониторинге

Таблица 2
Корреляционные связи (R) между содержанием НЖК в КВВ и клинико-функциональными показателями у больных ХОБЛ

НЖК	Шкала Paggiaro	SpO ₂	pCO ₂	HCO ₃ ⁻	ЧДД	ЧСС	СДЛА	Одышка	ФЖЕЛ
Изокапроновая кислота	-	-	-	-	0,62	0,6	0,47	-	-
Лауриновая кислота	-	-	-	-	-	-	0,58	-	-
Миристиновая кислота	0,58	-0,45	-	-	0,48	-	0,73	0,52	-
Пентадекановая кислота	-	-0,48	0,79	0,74	0,56	-	-	-	-
Стеариновая кислота	-	-0,51	-	-	-	-	-	-	-
Каприловая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,50
Энантовая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,61
Капроновая кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,46

Примечание: r – коэффициент корреляции по Спирмену; p < 0,05.

течения и выделения субфенотипов ХОБЛ, а также оценки ответа на проводимое лечение.

Белки и пептиды

Расшифровка генома человека, создание общедоступных баз данных генетических структур в сочетании с развитым методом МС белков обеспечивают уникальные возможности идентификации белков в различных жидкостях и тканях человека [20, 26–28].

С целью оценки возможности использования протеомного анализа для диагностики болезней легких проведено определение содержания белков и пептидов в КВВ у больных с обострением ХОБЛ. Анализ белкового состава КВВ проводили с использованием метода нанопоточной высокоэффективной жидкостной хроматографии и МС, поиск и идентификацию белков проводили по базе данных белковых последовательностей NCBI [54, 55].

В образцах КВВ курящих больных ХОБЛ обнаружены цитоскелетные кератины-3 и 17, нехарактерные для протеома КВВ здоровых людей. Цитоскелетные кератины составляют большую часть по количеству и содержанию вещества из белков, идентифицированных в КВВ здоровых некурящих добровольцев. Кератин-17 экспрессируется в базальных и супрабазальных клетках бронхов здоровых людей, однако в КВВ здоровых лиц не обнаруживается. Диагностическая значимость кератина-3 в КВВ пока неясна.

Также в КВВ были идентифицированы некератиновые компоненты клетки: профилаггрин, хорнерин и элементы десмосом (десмоглеин, десмоплакин III), которые не обнаруживались в образцах здоровых лиц (табл. 3). Профилаггрин (филаггрин) является кальцийсвязывающим белком цитоскелета. Обнаружение десмоплакина в КВВ свидетельствует о повышенной деструкции эпителия респираторного тракта [55].

Определение уровня рН и белкового состава КВВ проводилось при мониторинге состояния больной, которой в 2006 г. впервые в России успешно проведена билатеральная трансплантация легких. Стабильный уровень уровня рН КВВ указывал на благоприятное течение послеоперационного периода (отсутствие данных за отторжение аллографта и развитие инфек-

ционных осложнений). Анализ белкового спектра КВВ продемонстрировал динамику изменения состояния дыхательной системы пациента в процессе лечения. В КВВ, полученном через 15 мес. после операции и позднее, были идентифицированы белки, характерные для людей без патологии органов дыхания: кератины 1 / 10, 2 / 9 и 5 / 14, дермцидин, цистатин А и убиквитин. Таким образом, анализ белкового состава КВВ характеризует процесс адаптации пересаженных легких (аллографта) [54].

Идентифицированные характеристические пептиды белков, обнаруженные в КВВ у пациентов с ХОБЛ, также обнаруживаются в бронхоальвеолярных смывах, крови и моче больных. Таким образом, данные белковые фрагменты можно рассматривать в качестве биомаркеров ХОБЛ.

Цитокины

Клетки воспаления и структурные клетки респираторной системы способны синтезировать различные

Таблица 3
Некератиновые пептиды и белки, идентифицированные в образцах КВВ больных ХОБЛ

Здоровые лица	Больные ХОБЛ
Дермцидин	Zn- α -2-гликопротеин
α -Тубулин	Фрагменты коллагенов
Альбумин	Остеопонтин
Обогащенный пролином белок-4	Простагландин H2D-изомеразы
Цистатин А	Хорнерин
Тирозин-3 / триптофан-5-монооксигеназа	Профилаггрин
Убиквитин	Элементы десмосом (десмоплакин, десмоколлин, десмоглеин)
Предшественник липокалина-1	Фрагменты актина и миозина
S100 кальцийсвязывающий белок A9	Динеин
Предшественник α -1-микроглобулина / бикунина	
Простагландин человека	
H2D-изомеразы	
Супрабазин	
Протеогликан сульфата гепарана	
Иммуноглобулин HA1	

цитокины [51]. С помощью иммуноферментного анализа было обнаружено повышение концентрации IL-6, TNF- α (провоспалительных цитокинов) и IL-10 (регуляторного цитокина) в КВВ у здоровых курильщиков и больных ХОБЛ [49, 50, 52, 53]. K.W.Garey et al. продемонстрировали более высокий уровень общего белка в КВВ у курильщиков и больных ХОБЛ по сравнению с некурящими людьми, но не было различий в концентрациях IL-1 β или TNF- α . У молодых курильщиков в КВВ также обнаружено повышение концентрации IL-1 β [15].

В исследовании с использованием мультиплексного анализа обнаружено повышение уровня цитокинов (IL-1 β , 6, 8, 10, 12p70 и TNF- α) в КВВ у больных с обострением ХОБЛ по сравнению со стабильными пациентами [51]. Это исследование показывает, что цитокины КВВ могут быть полезными биомаркерами при оценке обострений ХОБЛ.

Другие молекулы и вещества

В КВВ также определяются другие молекулы, включая малоновый диальдегид [56], эритропоэтин и TNF- α [57], α_1 -антитрипсин [4], интерферон- γ и миелопероксидазу [58], нейтрофильные протеолитические ферменты – нейтрофильную эластазу, протеиназу-3 и катепсин-G [36], различные пурины, в т. ч. аденозин [11, 59], микроэлементы и токсичные металлы [60], а также другие маркеры, которые дают важную информацию о патогенезе ХОБЛ.

Заключение

Выдыхаемый воздух и КВВ содержат множество биомаркеров в ультранизких концентрациях. Дальнейшее развитие методов анализа КВВ с использованием биосенсоров (для определения различных липидных медиаторов в режиме онлайн), технологий метабомики (для обнаружения сотен тысяч метаболитов) и протеомики (для определения белковых соединений) позволит выявить специфичные биомаркеры ХОБЛ. Сбор КВВ может быть полезным для быстрого определения инфекционного обострения ХОБЛ с помощью метода полимеразной цепной реакции. Исследование КВВ может доказать свою пользу при скрининге ХОБЛ, поможет проследить течение заболевания и предсказать эффект от проводимого лечения. Анализ КВВ встанет в один ряд с другими методами и позволит решить ряд проблем медицины, связанных с патофизиологией ХОБЛ и других заболеваний респираторного тракта.

Литература

1. Fischer B.M., Pavlisko E., Voynow J.A. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulm. Dis.* 2011; 6: 413–421.
2. Donaldson G.C., Seemungal T.A., Patel I.S. et al. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 2005; 128: 1995–2004.
3. Borrill Z.L., Roy K., Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur. Respir. J.* 2008; 32 (2): 472–486.

4. Koczulla A.R., Noeske S., Herr C. et al. Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients. *Respir. Med.* 2012; 106 (1): 120–126.
5. Gerritsen W.B., Asin J., Zanen P. et al. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir. Med.* 2005; 99: 84–90.
6. Leigh R., Pizzichini M.M., Morris M.M. et al. Stable COPD: predicting benefit from high-dose inhaled corticosteroid treatment. *Eur. Respir. J.* 2006; 27: 964–971.
7. Brightling C.E., McKenna S., Hargadon B. et al. Sputum eosinophilia and the short term response to inhaled mometasone in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005; 60: 193–198.
8. Hurst J.R., Donaldson G.C., Perera W.R. et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 174: 867–874.
9. Papaioannou A.I., Mazioti A., Kiropoulos T. et al. Systemic and airway inflammation and the presence of emphysema in patients with COPD. *Respir. Med.* 2010; 104 (2): 275–282.
10. Horvath I., Hunt J., Barnes P.J. et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.* 2005; 26: 523–548.
11. Popov T.A. Human exhaled breath analysis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2011; 106 (6): 451–456.
12. Taylor D.R. Using biomarkers in the assessment of airways disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 128 (5): 927–934.
13. Hoffmeyer F., Raulf-Heimsoth M., Bruning T. Exhaled breath condensate and airway inflammation. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2009; 9 (1): 16–22.
14. Lee W., Thomas P.S. Oxidative stress in COPD and its measurement through exhaled breath condensate. *Clin. Transl. Sci.* 2009; 2 (2): 150–155.
15. Garey K.W., Neuhauser M.M., Robbins R.A. et al. Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest* 2004; 125: 22–26.
16. Kostikas K., Papatheodorou G., Psathakis K. et al. Oxidative stress in expired breath condensate of patients with COPD. *Chest* 2003; 124: 1373–1380.
17. Grob N.M., Aytakin M., Dweik R.A. Biomarkers in exhaled breath condensate: a review of collection, processing and analysis. *J. Breath Res.* 2008; 2 (3): 037004.
18. Montuschi P., Collins J.V., Ciabattini G. et al. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162: 1175–1177.
19. Montuschi P., Kharitonov S.A., Ciabattini G., Barnes P.J. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003; 58: 585–588.
20. Lin J.L., Bonnicksen M.H., Nogeh E.U. et al. Proteomics in detection and monitoring of asthma and smoking-related lung diseases. *Expert. Rev. Proteomics* 2010; 7 (3): 361–372.
21. Родионов А.А., Ревельский А.И., Ревельский И.А. и др. Хроматомасс-спектрометрическое определение среднелетучих органических веществ в конденсате выдыхаемого воздуха. *Масс-спектрометрия* 2007; 4 (2): 143–148.
22. Fens N., Zwinderman A.H., van der Schee M.P. et al. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 180 (11): 1076–1082.
23. Анохина Т.Н. Новые биомаркеры – среднелетучие метаболиты в конденсате выдыхаемого воздуха при брон-

- химальной астме и хронической обструктивной болезни легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 2012.
24. *de Laurentiis G., Paris D., Melck D. et al.* Metabonomic analysis of exhaled breath condensate in adults by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur. Respir. J.* 2008; 32: 1175–1183.
 25. *Nicholson J.K.* Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol. Syst. Biol.* 2006; 2: 52.
 26. *Crameri R.* The potential of proteomics and peptidomics for allergy and asthma research. *Allergy* 2005; 60 (10): 1227–1237.
 27. *Conrad D.H., Goyette J., Thomas P.S.* Proteomics as a method for early detection of cancer: a review of proteomics, exhaled breath condensate, and lung cancer screening. *J. Gen. Intern. Med.* 2008; 23 (Suppl. 1): 78–84.
 28. *Sepper R., Prikk K.* Proteomics: is it an approach to understand the progression of chronic lung disorders? *J. Proteome Res.* 2004; 3 (2): 277–281.
 29. *Montuschi P., Kharitonov S.A., Barnes P.J.* Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD. *Chest* 2001; 120 (2): 496–501.
 30. *Liu J., Sandrini A., Thurston M.C. et al.* Nitric oxide and exhaled breath nitrite/nitrates in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiration* 2007; 74 (6): 617–623.
 31. *Ferreira I.M., Hazari M.S., Gutierrez C. et al.* Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: effect of inhaled beclomethasone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 164: 1012–1015.
 32. *Paredi P., Kharitonov S.A., Leak D. et al.* Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation, is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162 (2, Pt 1): 369–373.
 33. *Moser B., Bodrogi F., Eibl G. et al.* Mass spectrometric profile of exhaled breath – field study by PTR-MS. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2005; 145: 295–300.
 34. *Dragonieri S., Schot R., Mertens B.J. et al.* An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 120: 856–862.
 35. *Borrill Z., Starkey C., Vestbo J., Singh D.* Reproducibility of exhaled breath condensate pH in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 2005; 25: 269–274.
 36. *Анаев Э.Х., Чучалин А.Г.* Конденсат выдыхаемого воздуха в диагностике и оценке эффективности лечения болезней органов дыхания. *Пульмонология* 2006; 4: 12–20.
 37. *Antus B., Barta I., Kullmann T. et al.* Assessment of exhaled breath condensate pH in exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: A longitudinal study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 182 (12): 1492–1497.
 38. *Kostikas K., Papatheodorou G., Ganas K. et al.* pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 165: 1364–1370.
 39. *Corradi M., Montuschi P., Donnelly L.E. et al.* Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163: 854–858.
 40. *Antczak A., Ciebiada M., Pietras T. et al.* Exhaled eicosanoids and biomarkers of oxidative stress in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch. Med. Sci.* 2012; 8 (2): 277–285.
 41. *Montuschi P., Macagno F., Parente P. et al.* Effects of cyclooxygenase inhibition on exhaled eicosanoids in patients with COPD. *Thorax* 2005; 60: 827–833.
 42. *Biernacki W.A., Kharitonov S.A., Barnes P.J.* Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 2003; 58: 294–298.
 43. *Papi A., Bellettato C.M., Braccioni F. et al.* Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006; 173: 1114–1121.
 44. *Ko F.W., Lau C.Y., Leung T.F. et al.* Exhaled breath condensate levels of 8-isoprostane, growth related oncogene alpha and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 2006; 100: 630–638.
 45. *Nowak D., Kasielski M., Antczak A. et al.* Increased content of thiobarbituric acid reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir. Med.* 1999; 93: 389–396.
 46. *Dekhuijzen P.N., Aben K.K., Dekker I. et al.* Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154: 813–816.
 47. *van Beurden W.J., Harff G.A., Dekhuijzen P.N. et al.* Effects of inhaled corticosteroids with different lung deposition on exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients. *Respiration* 2003; 70: 242–248.
 48. *Kasielski M., Nowak D.* Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 2001; 95: 448–456.
 49. *Carpagnano G.E., Foschino Barbaro M.P., Cagnazzo M. et al.* Use of exhaled breath condensate in the study of airway inflammation after hypertonic saline solution challenge. *Chest* 2005; 128: 3159–3166.
 50. *Carpagnano G.E., Kharitonov S.A., Foschino-Barbaro M.P. et al.* Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur. Respir. J.* 2003; 21: 589–593.
 51. *Gessner C., Scheibe R., Wotzel M. et al.* Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 2005; 99: 1229–1240.
 52. *Ko F.W., Leung T.F., Wong G.W. et al.* Measurement of tumor necrosis factor-alpha, leukotriene B4, and interleukin 8 in the exhaled breath condensate in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulm. Dis.* 2009; 4: 79–86.
 53. *Bucchioni E., Kharitonov S.A., Allegra L., Barnes P.J.* High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir. Med.* 2003; 97 (12): 1299–1302.
 54. *Курова В.С., Анаев Э.Х., Кононихин А.С. и др.* Масс-спектрометрический мониторинг белкового состава конденсата выдыхаемого воздуха больного, перенесшего трансплантацию легких. *Изв. РАН. Сер. хим.* 2010; 1: 284–288.
 55. *Анаев Э.Х., Кушаева М.Э., Курова В.С. и др.* Значение протеомного анализа конденсата выдыхаемого воздуха при диагностике ХОБЛ и пневмонии. *Пульмонология* 2012; 5: 5–9.
 56. *Bartoli M.L., Novelli F., Costa F. et al.* Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators Inflamm.* 2011; 891752. doi: 10.1155/2011/891752.
 57. *Schumann C., Triantafilou K., Krueger S. et al.* Detection of erythropoietin in exhaled breath condensate of nonhypoxic subjects using a multiplex bead array. *Mediators Inflamm.* 2006; 18061.

58. *Tateosian N.L., Costa M.J., Guerrieri D. et al.* Inflammatory mediators in exhaled breath condensate of healthy donors and exacerbated COPD patients. *Cytokine* 2012; 58 (3): 361–367.
59. *Esther C.R., Lazaar A.L., Bordonali E. et al.* Elevated airway purines in COPD. *Chest* 2011; 140 (4): 954–960.
60. *Corradi M., Acampa O., Goldoni M. et al.* Metallic elements in exhaled breath condensate and serum of patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Metallomics*. 2009; 1 (4): 339–345.

Информация об авторах

Анаев Эльдар Хусеевич – д. м. н., заведующий лабораторией неинвазивных методов диагностики клинического отдела ФГБУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России; тел.: (495) 465-53-84; e-mail: el_anaev@hotmail.com

Анохина Татьяна Николаевна – к. м. н., научный сотрудник лаборатории неинвазивных методов диагностики клинического отдела ФГБУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России; тел.: (495) 465-53-84; e-mail: dr-anokhina@yandex.ru

Кушаева Миясат Эльдаровна – младший научный сотрудник лаборатории неинвазивных методов диагностики клинического отдела ФГБУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России; тел.: (495) 465-53-84; e-mail: dr-miya@mail.ru

Чучалин Александр Григорьевич – академик РАМН, д. м. н., проф., директор ФГБУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России; тел.: (495) 465-52-64; e-mail: chuchalin@inbox.ru

Поступила 06.05.13

© Коллектив авторов

УДК 616.24-036.12-07:616.24-008.7-074