

Протеом термического гелиокса. Высокотемпературный гелиокс не вызывает разрушение клеток дыхательной системы человека

С.Д. Варфоломеев^{1,2}, А.А. Панин³, А.М. Рябоконе^{1,2}, А.С. Козыр², А.С. Кононихин², Л.В. Шогенова^{4,5}, А.Г. Чучалин⁴

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия;

²ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, Москва, Россия;

³ООО «Медтехинновации», Москва, Россия;

⁴ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

⁵ГБУЗ «Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Резюме

Цель. Проведение пилотного исследования по оценке влияния термического гелиокса на состояние респираторного тракта с помощью изучения белкового состава конденсата выдыхаемого воздуха до процедуры термического гелиокса, сразу после и спустя 3 ч релаксации.

Материалы и методы. Проведено сравнительное исследование белкового состава конденсатов выдыхаемого воздуха (КВВ) 5 некурящих здоровых доноров. КВВ отбирали до дыхательной процедуры, сразу после 20-минутной ингаляции, нагретой до 70°C смеси газов He/O₂ (70/30), и 3 ч спустя. Белковый состав определяли методом хромато-масс-спектрометрического анализа после селективного триптического гидролиза. Обработка результатов осуществлялась с использованием программы Mascot и базы данных UniProt.

Результаты. После процедуры гелиокса объем собираемого конденсата (1–1,5 мл) падает в среднем на 32% и практически восстанавливается после 3-часовой релаксации. Основная часть белков постоянна для всех проб, независимо от процедуры термического гелиокса. Это кератины, несколько белков иммунной системы (иммуноглобулины, белки комплимента), тубулин. В пробах после термического гелиокса наблюдается появление в небольших количествах дополнительных белков. Это белки мышечного метаболизма (актины и кальмодулины), фибриноген, следы гемоглобина, аполипопротеина, креатинкиназы В типа. После 3-часовой релаксации в КВВ исчезает тубулин.

Заключение. Большая часть выдыхаемых белков одинакова до, после процедуры и 3-часовой релаксации. Полученные результаты демонстрируют относительную безопасность применения высокотемпературного гелиокса как терапевтического средства.

Ключевые слова: термический гелиокс, терапия, конденсат выдыхаемого воздуха, протеом, масс-спектрометрический анализ.

Для цитирования: Варфоломеев С.Д., Панин А.А., Рябоконе А.М. и др. Протеом термического гелиокса. Высокотемпературный гелиокс не вызывает разрушение клеток дыхательной системы человека. Терапевтический архив. 2020; 92 (6): 69–72. DOI: 10.26442/00403660.2020.06.000769

Thermal heliox proteome. High-temperature heliox does not cause destruction of human respiratory system cells

S.D. Varfolomeev^{1,2}, A.A. Panin³, A.M. Ryabokon^{1,2}, A.S. Kozyr², A.S. Kononikhin², L.V. Shogenova^{4,5}, A.G. Chuchalin⁴

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, Moscow, Russia;

³Medtechinnovations, Moscow, Russia;

⁴Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

⁵Pletnev City Clinical Hospital, Moscow, Russia

Aim. Conducting a pilot study to assess the effect of thermal heliox on the state of the respiratory tract by studying of the exhaled breath condensate protein composition before the thermal heliox procedure, immediately after and after three hours of relaxation

Materials and methods. A comparative study of the exhaled breath condensates (EBC) protein composition of five non-smoking healthy donors was carried out. The EBC was taken before the respiratory procedure, immediately after a 20-minute inhalation by mixture of He/O₂ gases (70/30) heated to 70°C and 3 hours later. The protein composition was determined by chromatography-mass spectrometric analysis after selective tryptic hydrolysis. The results were processed using the Mascot program and the UniProt database.

Results. After the heliox procedure, the volume of the collected condensate (1–1.5 ml) decreases by an average of 32% and is practically restored after three hours of relaxation. Most proteins were consistent for all samples, regardless of the thermal heliox procedure. These are keratins, several proteins of the immune system (immunoglobulins, compliment proteins), tubulin. In samples after thermal heliox, the appearance of small amounts of additional proteins is observed. These are proteins of muscle metabolism (actin and calmodulin), fibrinogen, traces of hemoglobin, apolipoprotein, type B creatine kinase. After three hours of relaxation, tubulin disappears in the EBC.

Conclusion. Most exhaled proteins are the same before, after the procedure, and for three hours of relaxation. The results obtained demonstrate the relative safety of the use of high temperature heliox as a therapeutic agent.

Keywords: thermoheliox, therapy, exhaled breath condensate, proteome, mass spectrometry analysis.

For citation: Varfolomeev S.D., Panin A.A., Ryabokon A.M., et al. Thermal heliox proteome. High-temperature heliox does not cause destruction of human respiratory system cells. Therapeutic Archive. 2020; 92 (6): 69–72. DOI: 10.26442/00403660.2020.06.000769

КВВ – конденсат выдыхаемого воздуха
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

t-He/O₂ – высокотемпературная дыхательная смесь гелия и кислорода

Введение

Одним из современных научных направлений является бризомика (breathomica), перед которой стоят задачи поиска новых биологических маркеров болезней органов дыхания в конденсате выдыхаемого воздуха. Совместная работа двух коллективов дала возможность описать изменения спектра белков в конденсате выдыхаемого воздуха при таких заболеваниях, как пневмония, бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), рак легких, а также трансплантация легких. Обнадеживающие данные получены при исследовании протеома конденсата выдыхаемого воздуха при таких близких заболеваниях, какими являются бронхиальная астма и ХОБЛ. Удалось описать биологические маркеры, характерные для ХОБЛ. Особое внимание в цикле исследований уделено оценке эффективности и безопасности проводимых методов лечения.

Высокотемпературная дыхательная смесь гелия и кислорода (термический гелиокс, t-He/O₂) начинает активно применяться для лечения разнообразных заболеваний, включая ХОБЛ [1], ишемический инсульт [2], некоторые патологии беременности. Актуальным представляется использование термического гелиокса для лечения острых вирусных инфекций, включая поражение коронавирусом [3], а также применение высокотемпературной газовой смеси гелия и кислорода для стимуляции иммунной системы человека [4]. Вместе с тем влияние t-He/O₂ на организм человека представляется достаточно сложным и требует дополнительных исследований. Ключевой вопрос, на который требуется ответ в первую очередь, – не вызывает ли использование высоких температур (60°C и выше) существенного разрушительного воздействия на клеточные структуры системы дыхания с появлением в выдыхаемом воздухе белков деструктурированных клеток?

Цель исследования – проведение пилотного исследования по оценке влияния термического гелиокса на состояние респираторного тракта с помощью изучения белкового состава конденсата выдыхаемого воздуха до процедуры термического гелиокса, сразу после и спустя 3 ч релаксации.

Материалы и методы

В нашем пилотном исследовании приняли участие 5 некурящих здоровых доноров (Ж, 25±1). Пробы конденсата

выдыхаемого воздуха собирались по традиционной процедуре с помощью портативного конденсора и R-tube (Respiratory Research, США) [5, 6]. Дыхательную процедуру проводили нагретой до 70°C смесью газов He/O₂ (70/30) в течение 20 мин на аппарате «Гелиокс-экстрим» (ООО «Медтехинновации», Россия).

Пробоподготовка для масс-спектрометрии включала лиофилизацию пробы и селективный триптический гидролиз, расщепляющий белок по пептидным связям, содержащим лизин и аргинин [7]. Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС/МС) проводили на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., США) и масс-спектрометра LTQ FT Ultra (Thermo, Германия) в соответствии с ранее опубликованными протоколами [8]. Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов использовали для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы Mascot (Matrix Science, Лондон, Великобритания; версия 2.2.2). Для идентификации белков использовали базу данных Swiss-Prot Human из открытой базы данных последовательностей белков UniProt (Швейцария).

Результаты и обсуждение

Исследование белкового содержания конденсатов выдыхаемого воздуха (КВВ) – эффективный метод диагностики различных респираторных заболеваний. Нами этот метод использовался для ранней диагностики рака легких [9], ХОБЛ [10], астмы [11], биохимических процессов при трансплантации легкого [12]. Российские космонавты, работающие на Международной космической станции, проходят исследование на содержание белков в КВВ до и после космического полета [13].

Исследование влияния термического гелиокса на белковый состав КВВ дало следующие результаты.

1. После процедуры гелиокса объем собираемого конденсата (1–1,5 мл) падает в среднем на 32% и практически восстанавливается после 3-часовой релаксации (**рис. 1**). Волонтеры отмечают, что после процедуры процесс дыхания облегчается.

Особое внимание уделено при анализе полученных данных выделительной функции легких. Количество собранного конденсата после ингаляции термического гелия сокращалось на 1/3. Возникает вопрос об изменении количества жидкости конденсата: редукция конденсата связана с влиянием гелия, кислорода или же термического эффекта? Исходя из опыта ингаляции кислорода в терапевтических целях можно утверждать, что редукция количества конденсата обусловлена синергетическим действием кислорода и повышенной температуры вдыхаемой газовой смеси. Восстановление влаговыведительной функции легких происходило уже к 3-му часу после ингаляции нагретой смеси. Это следует иметь в виду при практическом применении гелия и кислорода, чтобы сочетать ингаляцию газовой смеси с ее увлажнением, как это обычно делается при ингаляции чистого кислорода.

2. В **таблице** приведены данные по белковому составу КВВ до, сразу после дыхательной процедуры терми-

Сведения об авторах:

Варфоломеев Сергей Дмитриевич – чл.-кор. РАН, д.х.н., проф., дир. Института физико-химических основ функционирования сети нейронов и искусственного интеллекта ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», науч. рук. ФГБУН «ИБХФ им. Н.М. Эмануэля»

Панин Александр Андреевич – д.э.н., ген. дир. ООО «Медтехинновации»

Козырь Анна Сергеевна – аспирант ФГБУН «ИБХФ им. Н.М. Эмануэля». ORCID: 0000-0001-6723-2963

Кониных Алексей Сергеевич – к.ф.-м.н., ст. науч. сотр. ФГБУН «ИБХФ им. Н.М. Эмануэля». ORCID: 0000-0002-2238-3458

Шогенова Людмила Владимировна – к.м.н., доц. каф. госпитальной терапии педиатрического фак-та ФГАОУ ВО «РНМУ им. Н.И. Пирогова», врач анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии ГБУЗ «ГКБ им. Д.Д. Плетнева». ORCID: 0000-0001-9285-9303

Чучалин Александр Григорьевич – акад. РАН, д.м.н., проф., зав. каф. госпитальной терапии педиатрического фак-та ФГАОУ ВО «РНМУ им. Н.И. Пирогова», председатель правления Российского респираторного общества. ORCID: 000-0002-5070-5450

Контактная информация:

Рябоконе Анна Монолитовна – к.х.н., ст. науч. сотр. ФГБУН «ИБХФ им. Н.М. Эмануэля», науч. сотр. каф. химической энзимологии химического фак-та ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова». Тел.: +7(916)542-10-93; e-mail: amryabokon@gmail.com; ORCID: 0000-0001-9043-9129

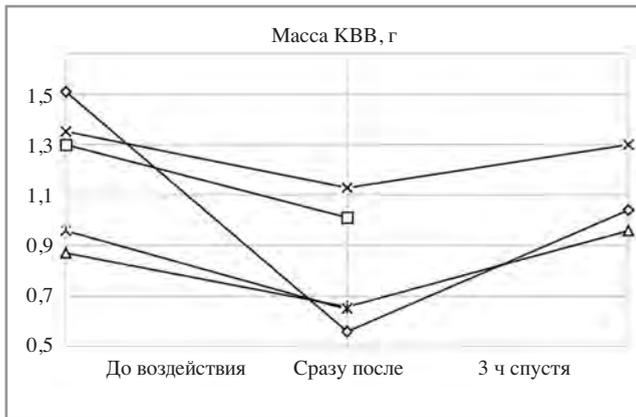


Рис. 1. Изменение массы образцов КВВ в зависимости от проведения процедуры t-He/O₂.

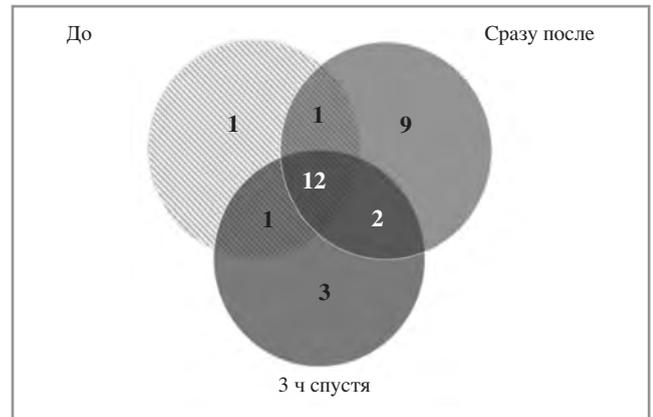


Рис. 2. Количество белков в пробах КВВ: до, сразу после и спустя 3 ч воздействия t-He/O₂.

ческого гелиокса и после 3-часовой релаксации. Все 3 образца дают общую картину, которую мы наблюдали во всех пробах КВВ, отбираемых у здоровых пациентов [14].

Это несколько белков иммуноглобулинового ряда, несколько структурных белков кератиновой природы, тубулин, кальмодулин. Такая общая типичная картина наблюдается для проб до процедуры гелиокса, сразу после и после 3-часовой релаксации. Следует обратить внимание на то, что в КВВ устойчиво проявляются белки иммунной системы (иммуноглобулины, белки комплемента). Эти же белки обнаруживаются в КВВ после дыхания смесью He/O₂ и после 3-часовой релаксации. Как известно, иммуноглобулины, прежде всего иммуноглобулин А, хорошо представлены в слизистой оболочке. Это, по-видимому, является причиной их присутствия в КВВ.

В пробах после термического гелиокса наблюдается появление в небольших количествах дополнительных белков.

Это белки мышечного метаболизма (актины и кальмодулины), фибриноген, следы гемоглобина, аполипопротеина, креатинкиназы В типа. После 3-часовой релаксации в КВВ исчезает тубулин.

Рис. 2 визуализирует совокупность полученных результатов. Видны зоны пересечения и количество различающихся белков (15 белков до t-He/O₂ процедуры, 24 сразу после и 18 белков спустя 3 ч после t-He/O₂) в образцах до, после и спустя 3 ч после процедуры.

Особое внимание привлекают данные о содержании иммуноглобулинов. Иммуноглобулины в КВВ отражают формирование местного (мукозального иммунитета). Полученные данные свидетельствуют о том, что уменьшение концентрации иммуноглобулинов не наступает после ингаляции t-He/O₂. Эти данные имеют принципиальное значение, дают основание исключить негативное влияние термического гелия и кислорода на продукцию иммуноглобулинов слизистой дыхательных путей. Таким образом, эффект

Белковый состав КВВ в зависимости от t-He/O₂

Белок	t-He/O ₂			Белок	t-He/O ₂		
	до	сразу после	3 ч спустя		до	сразу после	3 ч спустя
Desmoglein-1	+	+	+	Tubulin alpha-1C chain	+	+	-
Cystatin-A	+	+	+	Fibrinogen beta chain	-	+	+
Immunoglobulin heavy constant gamma 1	+	+	+	Hemoglobin subunit alpha	-	+	+
Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	+	+	+	Desmocollin-1	-	-	+
Immunoglobulin kappa constant	+	+	+	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	-	+
Complement C3	+	+	+	Actin, cytoplasmic 2	-	+	-
Desmoplakin	+	+	+	Creatine kinase B-type	-	+	-
Keratin, type I cytoskeletal 17	+	+	+	14-3-3 protein zeta/delta	-	+	-
Keratin, type I cytoskeletal 16	+	+	+	Keratin, type I cytoskeletal 13	-	+	-
Dermcidin	+	+	+	Actin, cytoplasmic 1	-	+	-
Keratin, type II cytoskeletal 5	+	+	+	Apolipoprotein A-I	-	+	-
Small proline-rich protein 3	+	+	+	Calmodulin-2	-	+	-
Keratin, type II cytoskeletal 6B	+	-	-	Calmodulin-3	-	+	-
Calmodulin-like protein 5	+	-	+	Calmodulin-1	-	+	-

газовой смеси не приводит к нарушению иммунологического барьера слизистых оболочек дыхательных путей.

Проведенные эксперименты демонстрируют тот факт, что драматического разрушения клеточек с переносом в выдыхаемый воздух большого количества белков не наблюдается. С заметным разрушением клеток в КВВ должны были бы появляться сотни внутриклеточных белков, осуществляющих весь спектр метаболизма. Как продемонстрировано в наших предыдущих работах, значительная деструкция клеток респираторного тракта и как следствие – появление внутриклеточных белков характерны для протеомов КВВ больных пневмонией (гистоны, изоформа хромосомного белка гибкого шарнирного домена) и ХОБЛ (субъединица ДНК-зависимой РНК-полимеразы, транскрипционный фактор AP-2Δ и др.) [8]. Также мы наблюдали значительное увеличение количества внутриклеточных белков в КВВ космонавтов

сразу после продолжительного полета и посадки спускаемого аппарата (центросомальный белок 290, каспаза – индуктор апоптоза, расщепляющий белок гольджин и пр.) [15].

Заключение

Таким образом, большая часть выдыхаемых белков одинакова до, после процедуры и 3-часовой релаксации. Полученные результаты демонстрируют относительную безопасность применения высокотемпературного гелиокса как терапевтического средства.

Масс-спектрометрический анализ образцов конденсата выдыхаемого воздуха проводился при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-2909158 МК.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Shogenova LV, Godyaev MY, Tretyakov AV, et al. Effect of t-HeO₂ on Central hemodynamics and oxygen transport in patients with COPD exacerbation and acute respiratory failure. *Eur Respir J.* 2019;54:PA2290. doi: 10.1183/13993003.congress-2019.PA2290
- Kim T, Chuchalin A, Martynov M, et al. Efficacy and safety of thermic helium-oxygen (t-He/O₂) mixture in reducing hypoxemia in acute ischemic stroke patients. *Eur Respir J.* 2019;54:PA2284. doi: 10.1183/13993003.congress-2019.PA2284
- Варфоломеев С.Д., Панин А.А., Быков В.И. и др. Кинетическая модель развития острой вирусной инфекции в организме человека. Критические условия, механизмы управления, «термогелиокс». *Вестн. Акад. наук. Сер. химическая.* 2020;6:1-6 [Varfolomeev SD, Panin AA, Bykov VI, et al. Kineticheskaia model' razvitiia ostroi virusnoi infektsii v organizme cheloveka. Kriticheskie usloviia, mekhanizmy upravleniia, "termogelioks". *Vestn. Akad. nauk. Ser. khimicheskaiia.* 2020;6:1-6 (In Russ.)].
- Варфоломеев С.Д., Панин А.А., Быков В.И., Цебеннова С.Б. Термовакцинация, термогелиокс как стимулятор иммунного ответа. Кинетическая модель развития процесса. *Известия Акад. наук. Сер. химическая.* 2020 (в печати) [Varfolomeev SD, Panin AA, Bykov VI, Tsebenova SB. Termovaktsinatsiia, termogelioks kak stimulator immunnogo otveta. Kineticheskaia model' razvitiia protsessa. *Izvestiia Akad. nauk. Ser. khimicheskaiia.* 2020 (In Russ.)].
- Рябоконе А.М., Анаев Э.Х., Кононихин А.С. и др. Сравнительный протеомный анализ конденсата выдыхаемого воздуха у пациентов с раком легкого методом масс-спектрометрии высокого разрешения. *Пульмонология.* 2014;1:5-11 [Ryabokon AM, Anaev EK, Kononikhin AS, et al. Comparative proteomic analysis of exhaled breath condensate in patients with lung carcinoma using high resolution mass-spectrometry. *Pulmonology* (In Russ.)]. doi: 10.18093/0869-0189-2014-0-1-5-11
- Anaev EK, Fedorchenko KYu, Kushaeva ME, et al. Diagnosis of lung diseases based on proteomic analysis of exhaled breath condensate. *Eur Respir J.* 2017;50(61):4939. doi: 10.1183/1393003.congress-2017.PA728
- Кононихин А.С., Захарова Н.В., Юсупов А.Э. и др. Исследование молекулярного состава конденсата выдыхаемого воздуха при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения. *Химическая физика.* 2019;38(12):59-63 [Kononikhin AS, Zakharova NV, Iusupov AE, et al. Issledovanie molekuliarnogo sostava kondensata vydychaemogo vozdukhа pri pomoshchi mass-spektrometrii vysokogo razresheniia. *Khimicheskaiia fizika.* 2019;38(12):59-63 (In Russ.)]. doi: 10.1134/S0207401X19120100
- Kononikhin AS, Fedorchenko KYu, Ryabokon AM, et al. Proteomic analysis of exhaled breath condensate for diagnostics of respiratory system diseases. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2016;10(3):230-4. doi: 10.1134/S1990750816030069
- Fedorchenko KU, Ryabokon AM, Kononikhin AS, et al. Early diagnosis of lung cancer based on proteome analysis of exhaled breath condensate. *Moscow University Chemistry Bulletin.* 2016;71(2):134-9. doi: 10.3103/S0027131416020036
- Анаев Э.Х., Кушаева М.Э., Курова В.С. и др. Значение протеомного анализа конденсата выдыхаемого воздуха при диагностике хронической обструктивной болезни легких и пневмонии. *Пульмонология.* 2012;5:5-9 [Anaev EK, Kushaeva ME, Kurova VS, et al. A role of proteomic analysis of exhaled breath condensate in diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease and pneumonia. *Pulmonologiya.* 2012;5:5-9 (In Russ.)]. doi: 10.18093/0869-0189-2012-0-5-5-9
- Anaev E, Fedorchenko K, Ryabokon A, et al. Eiweißmarker im Atemkondensat für Differentialdiagnose bei COPD und Asthma. *Pneumologie.* 2020;74(S01):64. doi: 10.1055/s-0039-3403197
- Курова В.С., Анаев Э.Х., Кононихин А.С. и др. Масс-спектрометрический мониторинг белкового состава конденсата выдыхаемого воздуха больного, перенесшего трансплантацию легких. *Известия Акад. наук. Сер. химическая.* 2010;1:284-8 [Kurova VS, Anaev ES, Kononikhin AS, et al. Mass spectrometric monitoring of exhaled breath condensate proteome of a patient after lung transplantation. *Russian Chemical Bulletin.* 2010;1:284-8 (In Russ.)]. doi: 10.1007/s11172-010-0076-5
- Kononikhin AS, Brzhozovskiy AG, Ryabokon AM, et al. Proteome profiling of the exhaled breath condensate after long-term spaceflights. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4518. doi: 10.3390/ijms20184518
- Курова В.С., Рябоконе А.М., Анаев Э.Х. и др. Протеомика конденсата выдыхаемого воздуха человека. Новая платформа для биомедицинской диагностики. В сб.: Постгеномные исследования и технологии. М.: МАКС Пресс, 2011; с. 174-202 [Kurova VS, Ryabokon AM, Anaev EK, et al. Proteomics of condensate of human exhaled air. New platform for biomedical diagnostics. In: Postgenomic Research and Technology. Moscow: MAKS Press, 2011; p. 174-202 (In Russ.)].
- Fedorchenko KYu, Ryabokon AM, Kononikhin AS, et al. The effect of space flight on the protein composition of the exhaled breath condensate of cosmonauts. *Russian chemical bulletin.* 2016;65(11):2745-50. doi: 10.1007/s11172-016-1645-z

Поступила 01.06.2020