

Muutused väljahingatud õhu kondensaadis astma ja kroonilise obstruktiivse kopsuhaiguse korral

Argo Aug^{1,2,5}, Katrina Luik², Kalle Kilk^{1,5}, Ursel Soomets^{1,5}, Jana Kivastik^{3,5}, Peet-Henn Kingisepp^{3,5}, Alan Altraja⁴

Eesmärgid. Uuringu eesmärgiks oli võrrelda mass-spektromeetria abil kroonilise obstruktiivse kopsuhaiguse (KOK) ja astmaga patsientide ning kontrollisikute hingeõhu kondensaadi (*exhaled breath condensate*, EBC) koostist ning seeläbi kontrollida EBC kui analüüsimaterjali kasutusvõimalust ning meetodika rakendatavust hingamisteede haiguste uurimisel. Ühtlasi püüti leida EBCst KOKi ja astma potentsiaalseid uusi haigusspetsiifilisi markereid.

Metoodika. Vedelikkromatograaf-tandemmass-spektromeetri (LC-MS-MS) abil saadi 21 kontrollisikult, 11 astmaga ja 9 KOKiga patsiendilt kogutud EBC-proovidest massispektrid, mida omavahel võrreldi.

Tulemused. Mass-spektrite võrdluses ilmnes erinev signaali intensiivsus nii astmaga kui ka KOKiga patsientide ja kontrollisikute rühma vahel massi-laengu suhte (m/z) 288 juures. KOKiga patsientidel oli see ainsaks erinevuseks, kuid astmapatsientide ja kontrollisikute võrdluses ilmnes erinevusi veel lisaks 91 erineva m/z juures.

Uuringu käigus võeti Eestis kasutusele meetod, mida saab EBC analüüsimiseks kasutada edaspidistes uurimistöodes.

Järeldused. Uuring näitas, et EBC koostises olevad ained moodustavad hingamisteede haigustele iseloomulikke mustreid ning väljahingatavas õhus võib olla kliiniliselt olulisi seni tundmata biomarkereid, mis tuleks kindlaks teha.

Inimene kaotab kopsude kaudu umbes 350 ml vett ööpäevas. Selle vee kondenseerimine, kogumine ning koostise analüüsimine on suhteliselt uus mitteinvasiivne võimalus uurida hingamisteede seisundit. Liu ja kaasautorite andmetel on väljahingatud õhu kondensaadi (*exhaled breath condensate*, EBC) mõistet esimesena kasutatud 1980. aastal (1). Viimastel aastatel on EBC analüüsimise rakendusvõimalustega intensiivselt tegelnud eri riikide uurijad. EBC koostise analüüsi tulemused lubavad avardada arusaamist hingamisteede haiguste patofüsioloogilistest ja biokeemilistest mehhanismidest. Seeläbi loodetakse leida ka uusi haiguste biomarkereid, et toetada diagnoosi ning hinnata haiguse prognoosi, kulgu ja reageerimist ravile. Töö üks eesmärke oli esimest korda Eestis rakendada EBC kogumise ja analüüsi meetodikat.

EBC sisaldab arvukalt erinevatest aineklassidest ja erineva molekulmassiga lenduvaid ja mittelenduvaid ühendeid (2), mille kontsentratsioone mõjutavad nii hingamisteede haigused kui ka nende puhul kasutatavad ravivõtted (3). EBCst leitavad ained satuvad selle koostisse erinevate bioloogiliste mehhanismide tõttu ning need pärinevad hingamisteede kõikidelt tasanditelt (vt joonis 1). Mittelenduvad ained satuvad väljahingatud õhu kondensaati põhiliselt hingamisteede epiteeli piirvedelikust (*epithelial lining fluid*) õhu liikumisel moodustuva aerosooli vedela faasi koosseisus. Lenduvad ained võivad sattuda kondensaati nii aerosooli vedelast faasist kui ka koos veeauruga hingeõhu gaasifaasist (3–5). Peamiselt on EBCs kopsude ja hingamisteede ainevahetuse produktid, kuid EBC koostises leidub ka aineid, mis

Eesti Arst 2011; 90(10):459–465

Saabunud toimetusse: 06.06.2011
Avaldatud internetis: 30.11.2011

¹ TÜ biokeemia instituut,
² TÜ farmaatsia instituut,
³ TÜ füsioloogia instituut,
⁴ TÜ kopsukliinik,
⁵ TÜ siirdemeditsiini tippkeskus

Korrespondeeriv autor:
Argo Aug
argo.aug@ut.ee

Võtmesõnad:
väljahingatud õhu kondensaat, mass-spektromeetria, biomarker, krooniline obstruktiivne kopsuhaigus, astma, metaboolomika

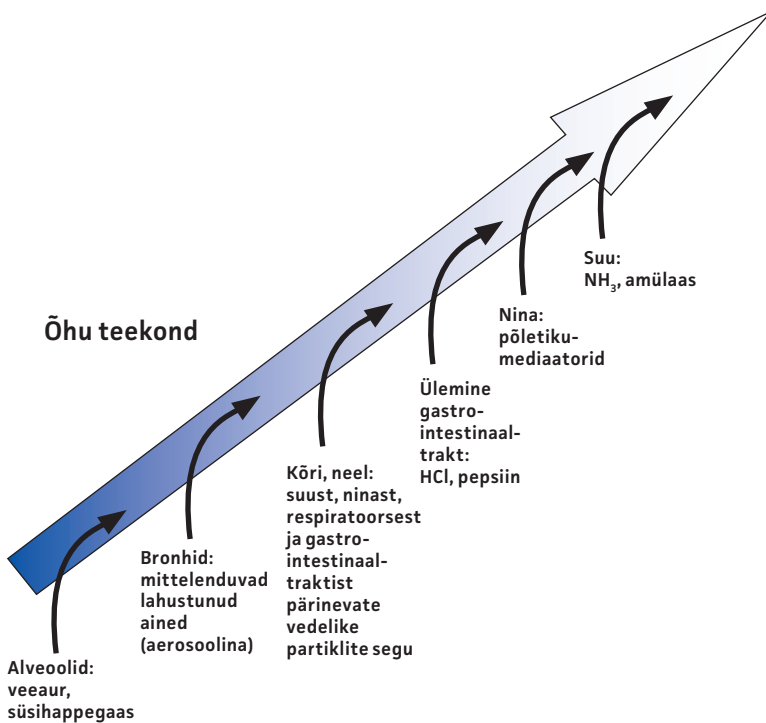
pärinevad muudest elunditest ning on verevooluga sealt kopsudesse kandunud (6). Seeläbi peegeldab EBC koostis lisaks hingamisteede seisundile ka haiguse nn süsteemset komponenti.

Kuigi EBCs olevate ainete kontsentratsioonid on väga väikesed, jäädes enamasti nanomolaarsesse suurusjärku, on seni leitud ainete spekter keemilise ehituse alusel küllaltki lai, sest ainuüksi lenduvaid orgaanilisi ühendeid on hingeõhust identifitseeritud üle 3000 (7). Seevastu on EBCs tuvastatud ainete kontsentratsioonide muutuste seostamine haigustega jäänud seni pigem tagasihoidlikuks ja mõneti ka vastuoluliseks. Näiteks erinesid kahes uuringus kroonilise obstruktiivse kopsuhaigusega (KOKiga) patsientide leukotrieen B₄ (LTB₄) kontsentratsioonid EBCs kümme korda, kuigi kasutati täpselt samasuguseid kondensaadi kogumise ja analüüsimise komplekte (8–10). Seetõttu peab ühe uuringu raames eri ajal kogutud proove analüüsima ühel ajal ning andmetöötles arvestama ainete sisalduste võimalike varieeruvustega EBCs.

Seni ongi enam tähelepanu pälvinud krooniliste põletikuliste haiguste (astma, KOK) ning mittespetsiifiliste põletikume-

diaatorite ekspressiooni võimalikud seosed. Vedelikkromatograaf-tandemmass-spektrometri (LC-MS-MS) abil on leitud põletikuvastast ravi mittesaanud astmahaigete EBCst LTB₄ suurenenud sisaldust (11, 12). On leitud, et mittesteroidsete põletikuvastaste ravimite kasutamine võib mõjutada LTB₄ ja prostaglandiin E₂ sisaldust EBCs (13). Seega tuleb EBC koostise interpreteerimisel alati silmas pidada, mis ravimeid uuritavad on kasutanud. Suitsetamine vahetult enne kondensaadi kogumist põhjustab järsult 8-isoprostaani ja vesinikperoksiidi taseme tõusu EBCs (9). Seepärast on oluline, et uuritavad enne uuringut ei suitsetaks. Mõni tund enne proovi kogumist peaks uuritav hoiduma toitudest ja jookidest, mis võivad mõjutada mõõdetavate ainete taset, näiteks peaks vältima kofeiini sisaldavaid jooke, kui on kavas mõõta adenosini sisaldust EBCs (4).

Enamikul juhtudest on EBC uurimisel püütud detekteerida ja mõõta seal kindlaid teadaolevaid komponente. Uuem lähenemiseviis on aga kasutada metaboolikat, mille all mõistetakse bioloogilistes proovides ainevahetuses osalevate ainete kompleksset kvalitatiivset ja kvantitatiivset uurimist (14). Metaboolikas kirjeldavad analüütilised mõõtmised ning mitmemuutujalised statistilised rakendused biokeemiliste muutuste üleüldist mustrit, nn sõrmejälge, mis on ainevahetuslike nihete puhul terviklikum ning ennustatavam kui ainevahetuse üksikute komponentide taseme muutused bioloogilistes vedelikes. Nii on näiteks „elektroonilise nina“ (autorite antud nimi 32-st elektri juhtivust mõõtvast andurist koosnevale gaasianalüsaatorile) abil kogutud ning peakomponentanalüüsi abil töödeldud andmete põhjal näidatud, et astma- ja KOKi haigete hingeõhu koostis on oluliselt erinev isegi ilma erinevust põhjustavaid aineid täpselt identifitseerimata (15). Varem on näidatud, et EBC koostise alusel on diskriminantanalüüsiga osalise vähimruutude meetodil võimalik kroonilise obstruktiivse kopsuhaigusega (KOK) haiged kontrollisikutest selgelt eristada (16). Eelnevat kokku võttes võib öelda, et KOKiga ja astmahaigete EBC analüüs pakub potentsiaalselt hulgaliselt uut infot, mistõttu on lisauuringud igati õigustatud ja vajalikud.



Joonis 1. Erinevad ained võivad sattuda hingeõhu kondensaati eri mehhanismidega erinevatelt hingamisteede tasanditelt (modifitseeritud allikast (2)).

Uurimistöö eesmärgid

1. Hinnata katseliselt EBC kogumise ning LC-MS-MS analüüsi meetodika rakendata-

vust Eesti oludes ning leida sobivad kriteeriumid mass-spektrogrammi analüüsiks.

2. Võrrelda mass-spektromeetria abil KOKi ja astmaga patsientide ning kontrollisikute hingeõhu kondensaadi koostist massi-laengu suhte (m/z) piirkonnas 50–999 ning seeläbi leida EBCst KOKile ja astmale potentsiaalseid uusi haigusspetsiifilisi markereid.

3. Kontrollida EBC kui analüüsimaterjali kasutusvõimalust hingamisteede haiguste uurimisel.

UURIMISMATERJAL JA -MEETODID

Valim

Uuringusse kaasati juhuslikustatult TÜ Kliinikumi kopsukliiniku KOKiga ($n = 9$) ja astmaga ($n = 11$) patsiente. Uuritavateks värvati nii ambulatoorset ravi saavad kui ka hospitaliseeritud patsiendid. Ei astmaga KOKi-patsientidel ei olnud olulisi kaasuvaid kroonilisi haigusi ega ägedaid respiratoorseid infektsioone viimase 2 kuu jooksul. Astma- ja KOKi-ravimeid oli neil lubatud tarvitada, lähtudes oma haiguse raskusastmest ning rahvusvahelistest standarditest ja ravijuhtnöördest (17, 18). Võrdlusrühmaks olid ealt ja soolt vastavad vabatahtlikud ($n = 21$). Uuringus kontrollisikuna osalemise eelduseks oli astma, KOK ja muude krooniliste hingamisteede haiguste puudumine, samuti ägedate respiratoorsete infektsioonide puudumine viimase 2 kuu jooksul ning muude krooniliste haiguste puhul nende kerge vorm ja täielik allumine ravile. Uuringus osalemine oli vabatahtlik ning kõik uuritavad andsid uuringus osalemiseks kirjaliku informeeritud nõusoleku. Kontrollrühma kuuluvad isikud täitsid lisaks küsimustiku oma tervisliku seisundi kohta. Uurimistöö protokoll kiitis heaks TÜ inimuuringute eetikakomitee (luba nr 155/10, 18.12.2006).

Kõikidel isikutel mõõdeti rahvusvaheliste standardite järgi (19) forsseeritud ekspiratoorne sekundimaht ja forsseeritud vitaalkapatsiteet spirograafi Spiro2000 (Medikro, Soome) abil.

EBC kogumine

EBC kogumise eel ei olnud uuringus osalejad 2 tunni jooksul söönud ega joonud midagi peale vee. Kondensaadi kogumise ajal oli uuritava nina näpitsaga suletud, ta hingas läbi huuliku oma tavapärase rütmi

ja sügavusega. Kogumisseadme (RTube, Respiratory Research, Austin, Texas, USA) jahutatud toru läbis ainult väljahingatud õhk. Kogumine toimus siseruumis. Kogumistoru ümbritsevat korduvalt kasutatavat metallist jahutuselementi oli eelnevalt hoitud $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Igalt inimeselt saadi 10minutilise protseduuri käigus 1–1,5 ml kondensaati, mis vahetult pärast proovi kogumist külmutati 500 μl kaupa eraldi tuubides ning säilitati kuni analüüsini $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures.

EBC analüüs

Külmutatud EBC-proovid lüofiliseeriti. Seejärel lahustati lüofilisaadid 150 μl vees (Riedel-de-Haën, mass-spektromeetria puhtusega) ning kanti üle kõrgsurve-vedelikkromatograafi (HPLC) (Shimadzu Prominence, Jaapan) automaatse proovisisestaja (*autosampler*) viaalidesse. Lüofilisaadi lahustamisel silmaga nähtavat lahustumatut jääki ei jäänud. Komponentide lahutamiseks kasutati jadamisi ühendatud kahte Phenomenex C18 $4 \times 2,0$ mm eelkolonni (SecurityGuard Cartridge, Phenomenex, USA). Voolutamine toimus 0,1% sipelghappelise vesi-atsetonitriilgradiendiga 5 kuni 100% atsetonitriili 30 min jooksul. HPLC oli ühendatud mass-spektromeetriga (LC/MS/MS Mass Spectrometer 3200 Q TRAP, Applied Biosystems, California, USA), mille täpsus massi määramisel on 300 ppm (osa miljonist ehk $\frac{\%}{100000}$).

Proovi ioniseerimine toimus $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja 5500 V juures. Analüüsi tulemusel saadi kõikidest proovidest mass-spektrid, mis näitasid proovides detekteeritud aineosakeste massi-laengu suhteid (m/z) ning vastavate osakeste hulka peegeldavat impulsside arvu.

Kogutud proovidest kasutati üht osa ($n = 24$) eelkatses, et leida sobivaimat seadistust EBCst mass-spektri saamiseks. Ülejäänud osa kogutud EBCst hoiustati $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures lõpliku analüüsini. Et veenduda tulemuste reprodutseeritavuses, analüüsiti 10päevase perioodi jooksul kõikide patsientide proovid uuesti.

Ainete identifitseerimiseks viidi mass-spektromeetriga läbi fragmenteerimine. Kasutati mass-spektromeetri ioonlõksu (*ion trap*) funktsiooni, mille abil m/z 288 osakesed peeti magnetväljas kinni ning seejärel lõhkumisenergiaga 30–50 V tekitatud fragmentidest saadi uus mass-spekter,

mida võrreldi üldkasutatavate mass-spektrite andmebaasidega (vt <http://www.hmdb.ca/> ja <http://metlin.scripps.edu/>).

Andmetöötlus

Kõik mass-spektrid summeeriti kogu kromatogrammi ulatuses, kasutades programmi Analyst (versioon 1.4.2, mass-spektrimeetri juhtimisprogramm), mida kasutatakse iga analüüsi toorandmete esmaseks vaatluseks ning graafiliseks taasesitamiseks. Andmehulkade parema töödeldavuse tarbeks keskmistati 0,1 m/z sammuga mõõdetud signaalide intensiivsused iga 1 ühiku kohta programmiga Mspin (versioon 1.1). Seejärel võrreldi proovide kromatogrammide summaarseid mass-spektreid. Programmi R (versioon 2.7.1) abil tehti peakomponentanalüüs eesmärgiga moodustada suuremast hulgast omavahel korreleeruvatest muutujatest (m/z 50, 51, ..., 999 signaalide intensiivsused) väiksem arv tunnuseid, mis omavahel ei korreleeruks. Peakomponendid on kõigi analüüsitava andmepunktide kovariatsiooni maatriksi omavektorid. Andmehulkade omavahelise suhestumise graafiline kujutamine suurimate peakomponentide dimensioonides annab võimaluse näha andmehulkade grupeerumisi neid eelnevalt klassifitseerimata. Lisaks peakom-

ponentanalüüsile eksporditi keskmistatud tulemused Microsoft Excel 2003 (versioon 11.8341.8341) töölehele. Kõikide m/z väärtuste signaalid normaliseeriti summaarse detekteeritud signaali (ehk bioloogilise materjali koguhulga) suhtes, s.t signaali tugevust väljendati mitte absoluuttugevusena, vaid protsendina kogusignaalist. Studenti t-testi kasutades leiti m/z väärtused, mille juures mass-spektrimeetri registreeritud impulsside arv haigetel ja kontrollidel erines oluliselt.

TULEMUSED

KOKi-patsiendid olid kõik suitsetajad (n = 5) või endised suitsetajad (n = 4), kes olid suitsetamisest loobunud vastavalt 8 kuud, 1, 5 või 10 aastat tagasi (vt tabel 1). Astmaga patsientide hulgas oli mittedsuitsetajaid (n = 7), suitsetajaid (n = 2) ja endisi suitsetajaid (n = 2), kes olid mõlemad suitsetamisest loobunud 7 aasta eest. Uuringus osalenud kontrollisikutest olid 15 mittedsuitsetajad ning 6 endised suitsetajad, kellest üks oli suitsetamisest loobunud 3 aasta eest, ülejäänud olid suitsetamisest loobunud vähemalt 8 aastat tagasi.

Kontrollisikutest ei olnud proovi võtmisele eelnenud kuu jooksul kasutanud ühtegi ravimit 11. Ülejäänud 10 tarvitasid mõnda

Tabel 1. Uuringus osalenute kirjeldus (andmed on esitatud absoluutarvudena, kui ei ole märgitud teisiti)

	Kontrollisikud	KOKiga patsiendid	Astmaga patsiendid
Arv	21	9	11
Neist mehi/naisi	10/11	8/1	1/10
Uuritavate kliiniline seisund			
- kerge persistentne astma			1
- keskmise raskusega persistentne astma / neist ägenemisega hospitaliseeritud			6/2
- raske persistentne astma / neist ägenemisega hospitaliseeritud			4/3
- raske KOKiga stabiilses faasis		2	
- väga raske KOKiga stabiilses faasis		1	
KOKi tõttu hospitaliseeritud		6	
Vanus aastates*	57,0 (47,0–63,5)	62,0 (57,0–68,0)	70,7 (52,2–73,6)
KMI, kg/m ² *	25,2 (23,7–28,3)	27,0 (21,4–33,6)	28,6 (23,1–41,8)
FEV ₁ , l*	3,1 (2,5–3,9)	0,9 (0,8–1,3)	1,3 (1,7–2,1)
FEV ₁ , % eeldatavast*	104 (94–118)	32 (27–44)	68 (51–77)
FVC, l*	3,9 (2,9–4,5)	2,1 (1,4–2,4)	2,1 (1,7–3,0)
FVC, % eeldatavast*	105 (92–115)	48 (41–52)	76 (66–87)
FEV ₁ /FVC*	0,77 (0,73–0,80)	0,63 (0,51–0,68)	0,75 (0,55–0,79)

KOK – krooniline obstruktiivne kopsuhaigus, KMI – kehamassi indeks, FEV₁ – forsseeritud ekspiraatorne sekundimaht,

FVC – forsseeritud vitaalkapaciteet.

* – Esitatud on mediaan (interkvartiilne vahemik).

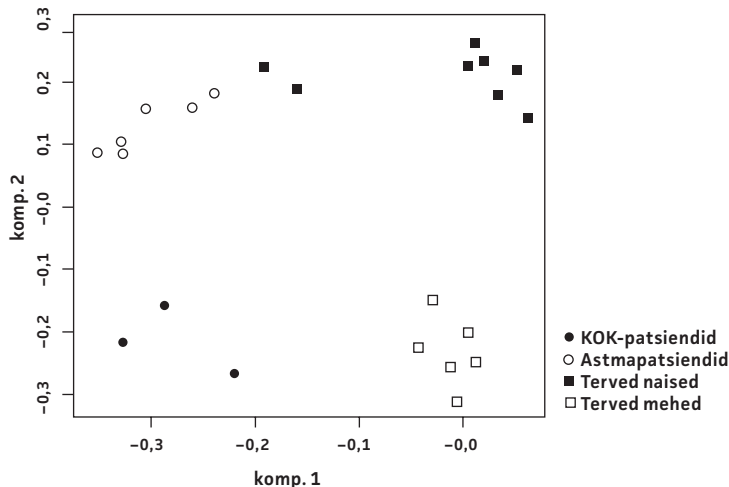
kõrgvererõhktõve ravimit, II tüüpi diabeedi ravimit, mittesteroidset põletikuvastast ravimit, glükokortikosteroidi, türoksiini või nende kombinatsiooni. Nimetatud ravimite tarvitamine või mittetarvitamine aga ei kajastunud analüüsitulemustes. Ka oli kolm kontrollisikut märkinud anamneesi viimase kuu jooksul põetud nohu, mis oli uuringu tegemise ajaks ilma aktiivse sekkumiseta möödunud.

Eelkatses tehtud peakomponentanalüüsi tulemusena eristusid uuritavate rühmad selgelt üksteisest (vt joonis 2), mis lubas edasise analüüsi käigus välja selgitada erinevuse põhjustanud m/z väärtused.

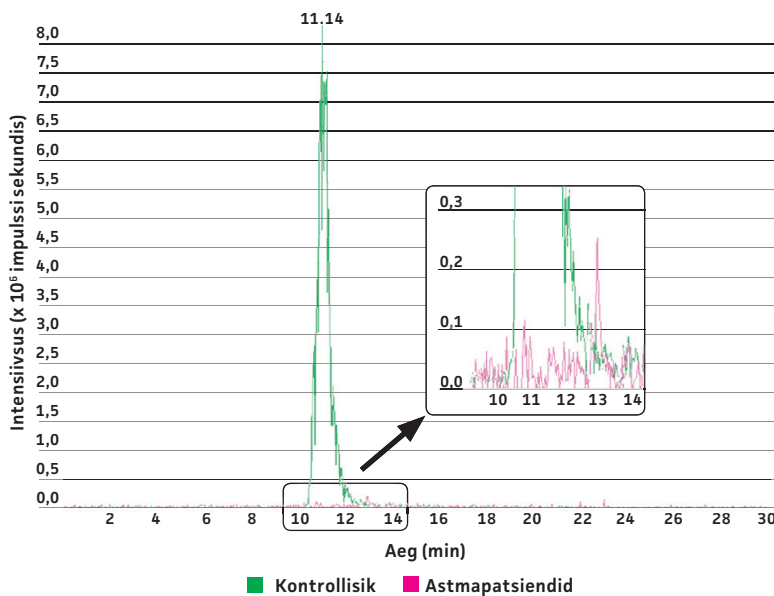
Ainsaks m/z väärtuseks, mille poolest KOKi-patsiendid erinesid oluliselt kontrollisikutest, oli 288 ($p = 0,0002$). Nimetatud m/z väärtusele vastavat ainet oli kontrollisikute EBCs oluliselt rohkem – selle signaal ei eristunud mürast ühelgi patsiendil, kuid joonistus selgelt välja 12 kontrollisikul 21-st (vt joonis 3). Seevastu esines astmapatsientide ning kontrollrühma võrdluses hulgaliselt m/z väärtusi, mille intensiivsus oli erinev: vastavalt $p < 0,05$ puhul oli neid 92 ja $p < 0,01$ korral 56, sealhulgas ka eelnimetatud m/z 288. M/z väärtusele 288 vastava aine kindlakstegemiseks sooritati mass-spektromeetriga fragmenteerimine (vt joonis 4). Selle tulemusel saadi aine molekulidele ainuomane fragmentide muster ehk nn sõrmejälg. Paraku ei õnnestunud andmebaasidest leida tuvastatud muustrile sobivat vastet, mistõttu ei ole kõnealuse aine identiteet ega taseme erinevuste põhjused praegu veel selgunud.

ARUTELU

EBC mass-spektrite peakomponentanalüüs (vt joonis 2) eristas KOKi ja astmaga patsiente selgesti kontrollisikutest. Patsientide ja kontrollisikute peakomponentanalüüsil esinenud lahknevus ei korreleerunud uuritavate suitsetamisharjumusega. Seega ei saa pidada tõenäoliseks, et suitsetamine oleks meie uuringu tulemusi oluliselt mõjutanud. See aga ei välista, et suurendades mõnda uuritavate rühma, võivad ilmneda ka grupisisesed suitsetamisest tingitud erinevused. Kontrollisikute tarvitatud ravimite kombinatsioonid olid kõik üksteisest erinevad, seega ei olnud võimalik tulemustes esile tõsta mingi ravimi või ravimite kombinatsiooni tarvitamise seost võimaliku EBC koostise muutumisega. Eelkatse peakompo-



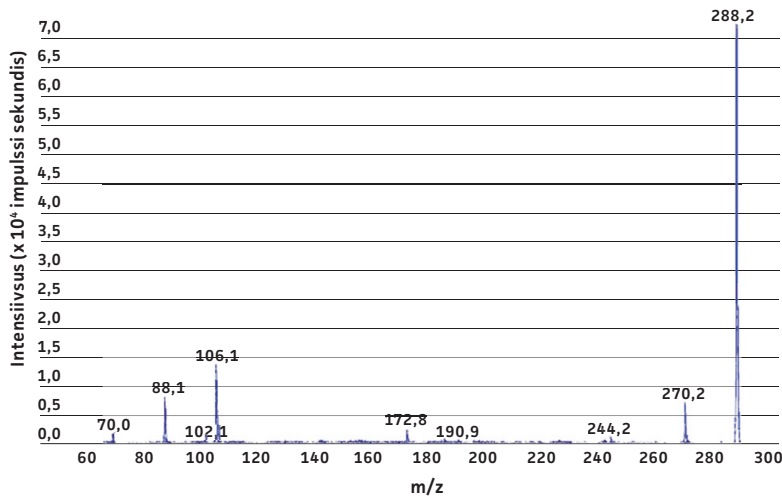
Joonis 2. Väljahingatava õhu kondensaadi peakomponentanalüüsi täisspektri alusel ($n = 24$). Telgedel kaks peakomponenti (komponendid 1 ja 2), mis kirjeldavad andmestikus esinevat kõige suuremat variaablust. Peakomponentanalüüs on asetanud erinevate inimeste proovide massispektrid (andmehulgad) kovariatsiooni kahemõõtmelisse maatriksisse, lähtudes massispektrites esinevate andmete (arvuliste väärtuste) sarnasusest või erinevusest.



Joonis 3. Juhuslikult valitud tüüpilise kontrollisiku ja tüüpilise astmahaige väljahingatud õhu kondensaadi spektri massi-laengu suhte (m/z) piirkonna 288,0–288,5 signaalide erinevus.

nentanalüüsi tulemuste (vt joonis 2) põhjal võib väita, et kopsuhaigustega patsientide ja kontrollisikute EBC metaboolsed erinevused ei ole kasutatud ravimite mõjustatud.

Küll aga sarnanes 3 kontrollisiku EBC oma spektri poolest pigem KOKi- või astmapatsientide omaga. Nendel kontrollisikutel välistati võimalik diagnoosimata KOK ja astma kliinilistel alustel, tuginedes teostatud spirograafiliste mõõtmiste andmetele.



Joonis 4. Massi-laengu suhtele (m/z) 288 vastava aine fragmenteerimisel detekteeritud osakeste mass-spekter. Mass-spektromeetriioonlõksu (*ion trap*) funktsiooni abil peeti m/z 288 osakesed magnetväljas kinni (isoleeriti) ning seejärel saadi lõhkumisenergiaga 30–50 V tekitatud fragmentidest uus mass-spekter, mis tervikuna on uuritavale ainele iseloomulik tunnus. Joonisel m/z väärtusega 288,2 tähistatud piik on omane fragmenteerumata molekulile, ülejäänud piigid näitavad algsest molekulist tekkinud fragmentide m/z väärtusi.

Seevastu selgus, et need 3 inimest olid samad isikud, kes olid viimase kuu jooksul põetud haiguste lahtrisse märkinud nohu, millega võibki tekkinud nihet seletada. Meeste ja naiste EBC koostise süsteemset erinevust on täheldatud ka teistes uuringutes (20, 21). Seda võib seletada suguhormoonide rolliga nii kopsude talitluses (22) kui ka organismi füsioloogias tervikuna. Varem on leitud, et naistel on välja hingatav lämmastikmonooksiidi (NO) kontsentratsioon suurem kui meestel (23), kuid võib arvata, et gaasilise NO sisaldus pole ainus erinevus meeste ja naiste väljahingatavas õhus.

Uuringu tulemused näitavad, et astmahaigete EBC koostis erineb tervete omast palju suurema arvu faktorite poolest kui KOKi-haigete EBC koostis. Kuigi joonisel 4 toodud spektrile sobivat vastet kättesaadavatest andmebaasidest ei leitud, võib oletada, et tegemist on suhteliselt stabiilse ainega, kuna seda õnnestus suures koguses tuvastada ka EBC-proovist, mida oli säilitatud pärast kogumist 1 aasta vältel. Samas tuleb märkida, et kuna EBC koostist võivad lisaks tervislikule seisundile mõjutada ka

paljud muud tegurid (kogumise aeg, proovi säilitamine jms), siis sedavõrd väikeselt hulgalt uuritavatelt saadud EBC-proovide analüüsil võivad jääda paljud potentsiaalselt kliinilist tähtsust omavad biomarkerite sisalduste muutused statistiliselt kinnitamata. Niisamuti võivad ka käesolevas uuringus statistiliselt oluliseks osutunud m/z intensiivsusega ained olla tegelikult kliiniliselt ebaolulised, mistõttu on vajalik need ained kindlaks teha ja tulemused nii kliinilisest kui ka bioloogilisest aspektist valideerida. Samas näitavad juba käesoleva uuringu tulemused, et EBC uurimine on perspektiivikas uute markerite leidmist silmas pidades, ent uute biomarkerite leidmiseks tuleb kasutada suuremat valimit.

JÄRELDUSED

Töö tulemusel on esimest korda Eestis kogutud väljahingatud õhu kondensaati (EBC) ja analüüsitud seda vedelikromatograaf-tandemmass-spektromeetri (LC-MS-MS) abil. Uurimuses kirjeldatud meetodika EBC kogumise ja analüüsimise jaoks võimaldab klassifitseerida kopsuhaigete ning kontrollisikute proove, tuvastades ka üksikuid signaale, mis on lahknemise põhjuseks. Sellest lähtuvalt on meetodikat sobilik kasutada ka edasistes uuringutes kopsuhaigustega kaasnevate või haigustele eelnevate markerite otsingutes.

Uuringuga leiti massi-laengu suhtele (m/z-le) 288 vastava aine näol üks potentsiaalselt oluline marker, mida tervete inimeste EBCs on statistiliselt oluliselt rohkem kui kroonilise obstruktiivse kopsuhaigusega (KOKiga) või astmaga isikutel. EBC mass-spektrites leidis 92 m/z piirkonda, mis erinesid statistiliselt oluliselt astmahaigetel ning kontrollisikutel.

TÄNUAVALDUS

Autorid tänavad kõiki uuringus osalejaid sellele pühendatud aja eest. Töö on valminud Eesti Teadusfondi grantide 6566, 7494 ja 7856, TU baasfinantseeritava teema PARBK 06906 ning Euroopa Regionaalarengu Fondi toetusel. Argo Augi teadustööd toetasid Silvere-Panti stipendium ning Kuusalu vallavalitsus.

VÕIMALIKU HUVIKONFLIKTI DEKLARATSIOON

Autorid kinnitavad, et neil puudub huvikonflikt seoses uuringu tegemisega.

SUMMARY

Changes in exhaled breath condensate in asthma and chronic obstructive pulmonary disease

Argo Aug^{1,2,5}, Katrina Luik², Kalle Kilk^{1,5}, Ursel Soomets^{1,5}, Jana Kivastik^{3,5}, Peet-Henn Kingisepp^{3,5}, Alan Altraja⁴

Aims. We aimed at determining differences between the composition of exhaled breath condensate (EBC) from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma and from control individuals with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Another aim of this study was to improve the methodology for EBC collection and analysis of samples with LC/MS/MS.

Methods. EBC was collected from 21 control individuals, from 11 patients with asthma and from 9 individuals with COPD and analysed with LC/MS/MS.

Results. A procedure appropriate to be used for analysis of EBC samples with LC/MS/MS was developed. Comparison of the mass spectra of EBC from the COPD and asthma patients with those from the controls revealed differently expressed substance with a mass-to-charge ratio (m/z) 288. In the asthma patients, additional 91 significant differences from the controls for m/z were found, indicating differences between the asthma patients and the controls in more EBC constituents than does COPD.

Conclusions. This pilot study demonstrates the existence of specific fingerprints in EBC composition for chronic inflammatory lung diseases. Further efforts are necessary to identify potential markers to validate their clinical relevance.

KIRJANDUS / REFERENCES

1. Liu J, Conrad DH, Chow S, Tran VH, Yates DH, Thomas PS. Collection devices influence the constituents of exhaled breath condensate. *Eur Respir J* 2007;30:807–8.
2. Effros RM, Dunning MB, 3rd, Biller J, Shaker R. The promise and perils of exhaled breath condensates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L1073–80.
3. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005;26:523–48.
4. Montuschi P. New perspectives in monitoring lung inflammation: analysis of exhaled breath condensate. CRC Press; 2005.
5. Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, et al. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 2005;5:10.
6. Effros RM, Biller J, Foss B, et al. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Resp Crit Care Med* 2003;168:1500–5.
7. Pennazza G, Santonico M, Martinelli E, D'Amico A, Di Natale C. Interpretation of exhaled volatile organic compounds. *Exhaled Biomarkers* 2010:115–29.
8. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003;58:585–8.
9. Borrill ZL, Roy K, Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur Respir J* 2008;32:472–86.
10. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 2003;58:294–8.
11. Montuschi P, Martello S, Felli M, Mondino C, Barnes PJ, Chiarotti M. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotriene B4 in asthmatic children. *Respir Res* 2005;6:119.
12. Montuschi P, Martello S, Felli M, Mondino C, Chiarotti M. Ion trap liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of leukotriene B4 in exhaled breath condensate. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:2723–9.
13. Montuschi P, Macagno F, Parente P, et al. Effects of cyclooxygenase inhibition on exhaled eicosanoids in patients with COPD. *Thorax* 2005;60:827–33.
14. Carraro S, Rezzi S, Reniero F, et al. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 2007;175:986–90.
15. Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, et al. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 2009;180:1076–82.
16. 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;32:1175–83.
17. GOLD. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. <http://www.goldcopd.org/Guidelineitem.asp?l1=2&l2=1&intId=2003>
18. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008;31:143–78.
19. Pellegrino R, Decramer M, van Schayck CP, et al. Quality control of spirometry: a lesson from the BRONCUS trial. *Eur Respir J* 2005;26:1104–9.
20. Hubbard HF, Sobus JR, Pleil JD, Madden MC, Tabucchi S. Application of novel method to measure endogenous VOCs in exhaled breath condensate before and after exposure to diesel exhaust. *Journal of Chromatography B* 2009;877:3652–8.
21. Diez-Pina JM, Fernandez-Acenero MJ, Llorente-Alonso MJ, Diaz-Lobato S, Mayoralas S, Florez A. Tumor necrosis factor alpha as a marker of systemic and local inflammation in "healthy" smokers. *International Journal of General Medicine* 2009;2:9–14.
22. Tam A, Morrish D, Wadsworth S, Dorscheid D, Man SF, Sin DD. The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Women's Health* 2011;11:24.
23. Cohen J, Douma WR, Ten Hacken NH, Oudkerk M, Postma DS. Physiology of the small airways: A gender difference? *Respiratory Medicine* 2008;102:1264–71.

¹ Department of Biochemistry, University of Tartu, Estonia,
² Department of Pharmacy, University of Tartu, Estonia,
³ Department of Physiology, University of Tartu, Estonia,
⁴ Department of Pulmonary Medicine, University of Tartu, Estonia,
⁵ Centre of Excellence for Translational Medicine, University of Tartu, Estonia

Correspondence to: Argo Aug argo.aug@ut.ee

Keywords: exhaled breath condensate, mass-spectrometry, biomarker, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, metabolomics