

## Изменение протеома конденсата выдыхаемого воздуха под влиянием ингаляционного водорода у пациентов с постковидным синдромом

Рябokonь А. М.<sup>1</sup>, Захарова Н. В.<sup>1</sup>, Индейкина М. И.<sup>1</sup>, Кононихин А. С.<sup>2</sup>, Шогенова Л. В.<sup>3</sup>, Медведев О. С.<sup>4</sup>, Костинов М. П.<sup>5,6</sup>, Свитич О. А.<sup>5</sup>, Kunio Ibaraki<sup>7</sup>, Hiroki Maehara<sup>8</sup>, Николаев Е. Н.<sup>2</sup>, Варфоломеев С. Д.<sup>1,9,10</sup>, Чучалин А. Г.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук. Москва, Россия; <sup>2</sup>Сколковский институт науки и технологий. Москва, Россия; <sup>3</sup>ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова" Минздрава России. Москва, Россия; <sup>4</sup>ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова". Факультет фундаментальной медицины. Москва, Россия; <sup>5</sup>ФГБНУ "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова". Москва, Россия; <sup>6</sup>ФГАУ ВО "Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)". Москва, Россия; <sup>7</sup>Department of Orthopedic Surgery, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus. Okinawa, Japan; <sup>8</sup>Hyperbaric Medicine, University of the Ryukyus Hospital. Okinawa, Japan; <sup>9</sup>Институт физико-химических основ функционирования сетей нейронов и искусственного интеллекта, ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова". Москва, Россия; <sup>10</sup>Химический факультет ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова". Москва, Россия

**Цель.** Изучить влияние ингаляционной терапии активной формой водорода (АФВ) на белковый состав конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) у пациентов с постковидным синдромом (ПКС).

**Материал и методы.** В рандомизированное контролируемое параллельное проспективное исследование были включены 60 пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию (COVID-19, CoronaVirus Disease 2019) с ПКС в период выздоровления, имеющих клинические проявления синдрома хронической усталости и получавших стандартную терапию по протоколу ведения пациентов с синдромом хронической усталости. Пациенты были разделены на 2 группы: 1 группа (основная) — 30 человек, которые получали стандартную терапию и ингаляции АФВ (аппарат "SUISONIA", Япония) на протяжении 10 сут., и 2 группа (контрольная) — 30 медицинских работников, которые получали только стандартную терапию. Пациенты обеих групп были сопоставимы по полу и среднему возрасту. У всех участников исследования в 1-е и 10-е сут. отбирали пробы КВВ. Образцы подвергали триптическому гидролизу и проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией анализ с использованием нанопоточного хроматографа (Dionex 3000) в тандеме с времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения (timsTOF Pro).

**Результаты.** С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения было суммарно идентифицировано 478 белков и 1350 пептидов. Число белков в пробах после терапии АФВ, в среднем, на 12% больше, чем до лечения. Анализ распределения белков по различным группам пациентов показал, что лишь половина этих белков (112) являются общими для всех групп образцов и выявляются в КВВ до, после и в независимости от водородной терапии. Кроме качественной разницы в белковых составах КВВ у различных групп, были выявлены и количественные изменения в концентрации 36 белков (в основном, структурных и защитных), которые в совокупности позволили

достоверно различить подгруппы до и после прохождения терапии. Важно отметить, что среди этих белков есть участники процессов свертывания крови ( $\alpha$ -1-антитрипсин), опосредованного хемокинами и цитокинами воспаления, и ряда сигнальных путей (цитоплазматический актин 2), ответа на окислительный стресс (тиоредоксин), гликолиза (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) и пр.

**Заключение.** Применение водородной терапии может способствовать переключению ряда физиологических процессов, что может влиять на успех восстановительного лечения при ПКС. В частности, полученные результаты указывают на активацию водородной терапией аэробного синтеза аденозинтрифосфата в митохондриях, что хорошо соотносится с выявленными лабораторными исследованиями снижением уровня лактата в крови исследованных пациентов. При этом важно, что данная терапия может тормозить провоспалительную активность, негативно влияя на процессы свертывания и сигнальные пути интегринов и апоптоза, и, кроме того, активировать защитные пути, цикл трикарбоновых кислот, FAS-сигналинг и метаболизм пурина, что может быть существенным для эффективного восстановления после перенесенной COVID-19.

**Ключевые слова:** постковидный синдром, реабилитация, активная форма водорода, конденсат выдыхаемого воздуха, протеом, масс-спектрометрия.

**Отношения и деятельность:** нет.

Поступила 10/01-2023

Рецензия получена 12/02-2023

Принята к публикации 13/02-2023



\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
e-mail: amryabokon@gmail.com

[Рябokonь А. М.\* — к.х.н., с.н.с., ORCID: 0000-0001-9043-9129, Захарова Н. В. — к.б.н., с.н.с., ORCID: 0000-0002-5267-0079, Индейкина М. И. — н.с., ORCID: 0000-0002-8177-7449, Кононихин А. С. — к.ф.-м.н., с.н.с., ORCID: 0000-0002-2238-3458, Шогенова Л. В. — к.м.н., доцент, ORCID: 0000-0001-9285-9303, Медведев О. С. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой, ORCID: 0000-0001-8942-4851, Костинов М. П. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией, зав. кафедрой, ORCID: 0000-0002-1382-9403, Свитич О. А. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор, ORCID: 0000-0003-1757-8389, Kunio Ibaraki — Emeritus Professor, ORCID: 0000-0003-4641-6979, Hiroki Maehara — Associate Professor, ORCID: 0000-0001-5897-9213, Николаев Е. Н. — д.ф.-м.н., член-корр. РАН, профессор, зав. лабораторией, ORCID: 0000-0001-6209-2068, Варфоломеев С. Д. — д.х.н., профессор, член-корр. РАН, научный руководитель, директор, профессор, ORCID: 0000-0003-2793-0710, Чучалин А. Г. — д.м.н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой, ORCID: 0000-0002-6808-5528].

**Для цитирования:** Рябоконт А. М., Захарова Н. В., Индейкина М. И., Кононихин А. С., Шогенова Л. В., Медведев О. С., Костин М. П., Свитич О. А., Куньо Ibaraki, Hiroki Maehara, Николаев Е. Н., Варфоломеев С. Д., Чучалин А. Г. Изменение протеома конденса-

та выдыхаемого воздуха под влиянием ингаляционного водорода у пациентов с постковидным синдромом. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2023;22(3):3517. doi:10.15829/1728-8800-2023-3517. EDN RKFRJK

## Changes in the proteomics of exhaled breath condensate under the influence of inhaled hydrogen in patients with post-COVID syndrome

Ryabokon A. M.<sup>1</sup>, Zakharova N. V.<sup>1</sup>, Indeikina M. I.<sup>1</sup>, Kononikhin A. S.<sup>2</sup>, Shogenova L. V.<sup>3</sup>, Medvedev O. S.<sup>4</sup>, Kostinov M. P.<sup>5,6</sup>, Svitich O. A.<sup>5</sup>, Kunio Ibaraki<sup>7</sup>, Hiroki Maehara<sup>8</sup>, Nikolaev E. N.<sup>2</sup>, Varfolomeev S. D.<sup>1,9,10</sup>, Chuchalin A. G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics. Moscow, Russia; <sup>2</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology. Moscow, Russia; <sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University. Moscow, Russia; <sup>4</sup>Lomonosov Moscow State University. Faculty of Fundamental Medicine. Moscow, Russia; <sup>5</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums. Moscow, Russia; <sup>6</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University. Moscow, Russia; <sup>7</sup>Department of Orthopedic Surgery, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus. Okinawa, Japan; <sup>8</sup>Hyperbaric Medicine, University of the Ryukyus Hospital. Okinawa, Japan; <sup>9</sup>Institute of Physicochemical Foundations of the Functioning of Neural Networks and Artificial Intelligence, Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia; <sup>10</sup>Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University. Moscow, Russia

**Aim.** To study the effect of inhalation therapy with an active hydrogen (AH) on the protein composition of exhaled breath condensate (EBC) in patients with post-COVID syndrome (PCS).

**Material and methods.** This randomized controlled parallel prospective study included 60 patients after coronavirus disease 2019 (COVID-19) with PCS during the recovery period and clinical manifestations of chronic fatigue syndrome who received standard therapy according to the protocol for managing patients with chronic fatigue syndrome (CFS). The patients were divided into 2 groups: group 1 (main) — 30 people who received standard therapy and AH inhalations (SUISONIA, Japan) for 10 days, and group 2 (control) — 30 medical workers who received only standard therapy. Patients in both groups were comparable in sex and mean age. All participants in the study were sampled with EBC on days 1 and 10. Samples were subjected to tryptic digestion and high-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry analysis using a nanoflow chromatograph (Dionex 3000) in tandem with a high-resolution time-of-flight mass spectrometer (timsTOF Pro).

**Results.** A total of 478 proteins and 1350 peptides were identified using high resolution mass spectrometry. The number of proteins in samples after AH therapy, on average, is 12% more than before treatment. An analysis of the distribution of proteins in different groups of patients showed that only half of these proteins (112) are common for all groups of samples and are detected in EBC before, after, and regardless of hydrogen therapy. In addition to the qualitative difference in the EBC protein compositions in different groups, quantitative changes in the concentration of 36 proteins (mainly structural and protective) were also revealed, which together made it possible to reliably distinguish between subgroups before and after treatment. It is worth noting that among these proteins there are participants of blood coagulation ( $\alpha$ -1-antitrypsin), chemokine- and cytokine-mediated inflammation, and a number of signaling pathways (cytoplasmic actin 2), response to oxidative stress (thioredoxin), glycolysis (glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase), etc.

**Conclusion.** The use of hydrogen therapy can contribute to the switching of a number of physiological processes, which may affect the success of recovery in PCS patients. In particular, the obtained results indicate the activation of aerobic synthesis of adenosine

triphosphate in mitochondria by hydrogen therapy, which correlates well with the decrease in the blood lactate level detected by laboratory studies. At the same time, this therapy can inhibit pro-inflammatory activity, negatively affecting the coagulation and signaling pathways of integrins and apoptosis, and, in addition, activate protective pathways, tricarboxylic acid cycle, FAS signaling, and purine metabolism, which may be essential for effective recovery after COVID-19.

**Keywords:** post-COVID syndrome, rehabilitation, active hydrogen, exhaled breath condensate, proteome, mass spectrometry.

**Relationships and Activities:** none.

Ryabokon A. M.\* ORCID: 0000-0001-9043-9129, Zakharova N. V. ORCID: 0000-0002-5267-0079, Indeikina M. I. ORCID: 0000-0002-8177-7449, Kononikhin A. S. ORCID: 0000-0002-2238-3458, Shogenova L. V. ORCID: 0000-0001-9285-9303, Medvedev O. S. ORCID: 0000-0001-8942-4851, Kostinov M. P. ORCID: 0000-0002-1382-9403, Svitich O. A. ORCID: 0000-0003-1757-8389, Kunio Ibaraki ORCID: 0000-0003-4641-6979, Hiroki Maehara ORCID: 0000-0001-5897-9213, Nikolaev E. N. ORCID: 0000-0001-6209-2068, Varfolomeev S. D. ORCID: 0000-0003-2793-0710, Chuchalin A. G. ORCID: 0000-0002-6808-5528.

\*Corresponding author:  
amryabokon@gmail.com

**Received:** 10/01-2023

**Revision Received:** 12/02-2023

**Accepted:** 13/02-2023

**For citation:** Ryabokon A. M., Zakharova N. V., Indeikina M. I., Kononikhin A. S., Shogenova L. V., Medvedev O. S., Kostinov M. P., Svitich O. A., Kunio Ibaraki, Hiroki Maehara, Nikolaev E. N., Varfolomeev S. D., Chuchalin A. G. Changes in the proteomics of exhaled breath condensate under the influence of inhaled hydrogen in patients with post-COVID syndrome. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2023;22(3):3517. doi:10.15829/1728-8800-2023-3517. EDN RKFRJK

### Ключевые моменты

#### Что известно о предмете исследования?

- Масс-спектрометрический анализ протеома конденсата выдыхаемого воздуха позволяет проводить неинвазивную диагностику заболеваний дыхательной системы.
- Интерес к терапии активной формой водорода основан на его антиоксидантных свойствах и способности влиять на окислительно-восстановительные процессы в сыворотке и тканях.

#### Что добавляют результаты исследования?

- Применение ингаляционной терапии активной формой водорода способствует переключению ряда физиологических процессов, что может влиять на успех реабилитации пациентов с постковидным синдромом.
- Полученные результаты указывают на активацию водородной терапией аэробного синтеза аденозинтрифосфата в митохондриях, а также существенное снижение доли провоспалительных процессов.

### Key messages

#### What is already known about the subject?

- Mass spectrometry of protein profile of exhaled breath condensate makes possible non-invasive diagnostics of respiratory diseases.
- Interest in active hydrogen therapy is based on its antioxidant properties and ability to influence serum and tissue oxidation-reduction reactions.

#### What might this study add?

- The use of inhalation therapy with active hydrogen contributes to the switching of some physiological processes, which may affect the success of the rehabilitation of post-COVID syndrome patients.
- The obtained results indicate the activation of aerobic mitochondrial synthesis of adenosine triphosphate by hydrogen therapy, as well as a significant decrease in the proportion of pro-inflammatory processes.

## Введение

Пандемия острого вирусного заболевания, вызванная распространением коронавируса SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), впервые зафиксирована в декабре 2019г в городе Ухань, КНР. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения на 4 декабря 2022г, во всем мире зарегистрировано >641 млн подтвержденных случаев заболевания и 6,6 млн смертей<sup>1</sup>.

Особое внимание в процессе пандемии было уделено постковидному синдрому (ПКС). Согласно Ballering AV, et al., из 8 пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию (COVID-19, CoronaVirus Disease 2019), у одного формировался ПКС [1]. В настоящее время выделяют две формы ПКС: ранний ПКС, который продолжается от 4 до 6 нед. от начала заболевания и может иметь тяжелой характер; если ПКС продолжается >3 мес., а в отдельных случаях до года, то эту форму обозначили как Long COVID-19. Клинические проявления ПКС зависят от сопутствующих заболеваний пациентов, состояния их иммунной системы, эффективности медикаментозной терапии, назначенной в острый период заболевания. У 20% перенесших COVID-19 симптомы ПКС персистируют до 12 нед., а в 2,3% случаев — до 12 мес. [2]. Многие из этого контингента пациентов, перенесших ПКС, нуждаются в специализированном лечении,

регулярном наблюдении и в повторной госпитализации.

В течение пандемии было апробировано несколько вариантов клинических рекомендаций. В их основе лежало применение противовирусных препаратов, моноклональных антител. В более тяжелых случаях проводились реанимационные мероприятия, включая неинвазивную вентиляцию и искусственную вентиляцию легких. Необходимо отметить высокую эффективность вакцинации как метода первичной профилактики.

Была выполнена серия работ по применению ингаляционной терапии активной формой водорода (АФВ) у пациентов с ПКС [3].

Возрастающий интерес к АФВ основан на его антиоксидантных свойствах и способности влиять на окислительно-восстановительные процессы. Вирусные инфекции, индуцирующие воспалительные реакции, иммунный ответ, приводят к образованию активных форм кислорода [4].

АФВ, являясь восстановителем, обладает эффективным антиоксидантным действием, нейтрализует провоспалительные медиаторы и, таким образом, способствует снижению миграции клеток воспаления в легочную ткань, тем самым сводя к минимуму степень повреждения легких [5]. Кроме того, терапия АФВ оказалась существенно эффективнее стандартно применяемой кислородной поддержки при обострениях хронической обструктивной болезни легких. Этот эффект достигается за счет снижения сопротивления потоку газов в дыхательных путях [6].

<sup>1</sup> <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19-7-december-2022>.

Объектом исследования в настоящей работе является конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ). Это научное направление метаболомики получило название бризомика.

КВВ является объектом исследования маркеров воспаления у пациентов с симптомами острой дыхательной недостаточности, перенесших COVID-19, а также служит для оценки эффективности проводимой терапии [7].

Протеомный анализ КВВ позволяет выявлять диагностические и прогностические белковые маркеры [8], а также способствует получению новых знаний о патофизиологических процессах в легких [9], в частности при COVID-19 и ПКС.

Цель настоящего исследования — изучение влияния ингаляционного водорода АФВ на протеом КВВ у пациентов с ПКС.

## Материал и методы

**Характеристика пациентов.** В рандомизированное контролируемое параллельное проспективное исследование были включены 60 пациентов, перенесших COVID-19 с ПКС в период выздоровления, имеющих клинические проявления синдрома хронической усталости (СХУ) и получавших стандартную терапию по протоколу ведения пациентов с СХУ. Пациенты были разделены на 2 группы: 1 группа (основная) — 30 человек, которые получали стандартную терапию и ингаляции АФВ (аппарат "SUISONIA", Япония) на протяжении 10 сут. и 2 группа (контрольная) — 30 медицинских работников, которые получали только стандартную терапию. Краткие данные пациентов представлены в таблице 1. Дизайн исследования и подробная характеристика больных, включенных в программу, описаны ранее [3].

**Ингаляционная терапия АФВ.** Ингаляционная терапия АФВ проводилась через носовую канюлю (Intersurgical Ltd, Великобритания), соединенную с аппаратом "SUISONIA" (Япония). Все пациенты подвергались процедуре ежедневно на протяжении 10 сут. в течение 90 мин согласно инструкции применения оборудования и опыта работы японских коллег.

**Сбор и пробоподготовка КВВ.** Образцы КВВ собирали в течение 10 мин с помощью специального стандартизованного аппарата Rtube ("Respiratory Research, Inc.", США) в соответствии с разработанными нами ранее протоколами и рекомендациями [10]. Аликвоты КВВ (объем ~1 мл) переносили в полипропиленовые пробирки, устойчивые к низким температурам со слабо-адсорбирующей поверхностью. Собирающую емкость допол-

нительно промывали органическим растворителем; полученный смыв объединяли с КВВ и лиофилизировали до полного высыхания. Высушенные образцы подвергали гидролизу — расщеплению белков с помощью трипсина (Promega, USA); пробы хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения протеомного анализа.

**Высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС).** Образцы триптических пептидов анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на основе системы нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, США) и времяпролетного масс-спектрометра высокого разрешения с ионной подвижностью timsTOF Pro (Bruker Daltonics, США). Хроматографическое разделение проводили на C18 капиллярной колонке-эмиттере (25 см×75 мкм, 1,6 мкм, Ion Optics, Parkville, Австралия) при скорости потока 400 нл/мин путем градиентного элюирования от 4 до 90% фазы В в течение 40 мин. Подвижная фаза А состояла из 0,1% муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В состояла из 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием метода сбора данных, зависящего от данных (DDA — data dependent acquisition), с параллельным накоплением и последовательной фрагментацией (PASEF). Источник ионизации электрораспылением (ESI) работал при напряжении 1500 В, смещении торцевой пластины 500 В и скорости потока газа-осушителя 3,0 л/мин при температуре  $180^{\circ}\text{C}$ . Измерения проводили в диапазоне  $m/z$  от 100 до 1700 Th. Подвижность ионов находилась в пределах от 0,60 до 1,60 В с/см<sup>2</sup>. Общее время цикла составило 1,88 с, а количество сканирований PASEF MS/MS было установлено равным 10.

**Статистический анализ.** Списки точных масс пептидов и масс их фрагментов были использованы для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., США, version 8.5). Для идентификации использовали следующие параметры поиска: фермент — трипсин; точность измерения масс родительского иона — 10/25 ppm; точность масс фрагментов — 0.5/0.05 Da; возможные модификации — окисление метионина (Oxidation (M): 15.99), деамидирование остатков глутамина и аспарагина (Deamidation (NQ): 0.98), а также модификации цистеинов во время пробоподготовки с помощью IAC или NEM (Carbamidomethylation: 57.02, N-ethylmaleimide on cysteines: 125.05). Также проводили анализ с использованием режима поиска с допустимым отклонением. Для обеспечения достоверности пороговое значение ложноположительных идентификаций устанавливалось на уровне

Таблица 1

Характеристика пациентов, участвующих в исследовании

	Основная группа		Контрольная группа	
	До терапии	После терапии	1 сут.	10 сут.
Число пациентов, n	30	27	30	21
Средний возраст, лет	51,6±11,3	52,8±10,0	51,2±8,7	50,6±6,6
М/Ж (%)	21/79	22/78	17/83	14/86

Примечание: М/Ж — мужчины/женщины.

Изменения протеома КВВ после водородной терапии



Рис. 1 Сравнительный анализ протеомного состава КВВ исследованных групп при помощи диаграммы Венна.

Примечания: в таблице 2 показано изменение доли белков с разными молекулярными функциями. В исходную группу включены образцы всех участников исследования в 1-е сут. исследования, до начала терапии; на 10-е сут. исследования отдельно показаны результаты для групп, принимавших и не принимавших терапию АФВ ("после терапии" и "без терапии"), соответственно. КВВ — конденсат выдыхаемого воздуха, COVID-19 — новая коронавирусная инфекция, COroonaVIrus Disease 2019 (коронавирусная инфекция 2019г).

не 0,1% для спектров, пептидов и белков. После идентификации пептидов и белков проводили количественный анализ их относительного содержания в группах образцов методом LFQ.

Для построения диаграммы Венна был использован ресурс <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>, анализ молекулярных функций белков проводили, используя ресурс <http://pantherdb.org/> [11].

## Результаты

Всего было исследовано 108 проб КВВ: 60 образцов на момент начала исследования и 48 образцов — в конечной точке (12 пациентов выбы-

ло по личным мотивам). Объем пробы собранного конденсата выдыхаемого воздуха составлял  $900 \pm 400$  мкл.

С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения было суммарно идентифицировано 478 белков и 1350 пептидов. Число белков в пробах после терапии АФВ, в среднем, на 12% больше, чем до нее (398 и 349, соответственно). Для более полного анализа были отобраны только белки, которые воспроизводились у >10% пациентов каждой из групп, их суммарное число составило 227. Анализ распределения белков по различным группам пациентов (рисунок 1) показывает, что лишь половина (112) этих белков являются общими для всех групп образцов и выявляются в КВВ до, после и в независимости от водородной терапии. Доминирующая часть этих белков имеет связывающие и каталитические функции, а также структурную молекулярную активность (таблица 2) и, в частности, представлена актинами, миозинами и коллагенами, которые участвуют в воспалении, опосредованном хемокиновыми и цитокиновыми путями, Rho гуанозинтрифосфатазной регуляции цитоскелета, интегриновом сигналинге и сигналинге никотинового ацетилхолинового рецептора, а также участвующими в гликолизе  $\alpha$ -енолазой, триозофосфатизомеразой, пируваткиназой и глицеральдегид-3-фосфатизомеразой.

Среди остальных особенно следует отметить белки, которые есть только в исходной группе и перестают выявляться в КВВ после стандартной и ингаляции АФВ (39), а также белки, которые появляются в образцах двух групп на 10-е сут.: 25 из них появляются в обеих группах, 14 — только в контрольной группе, 20 — только в основной группе (рисунок 2).

Кроме качественной разницы в белковых составах КВВ у различных групп, были выявлены и количественные изменения.

В некоторых исходных пробах обеих групп можно наблюдать значительное увеличение интенсивности белков, коррелирующих с анамнезом па-

Таблица 2

### Молекулярные функции белков КВВ (%)

Функция	Группа белков (см. рисунок 2)						
	112	6	39	11	20	25	14
Связывание	43,0	50,0	34,2	60,0	22,2	36,4	53,3
Каталитическая активность	30,0	33,3	39,5	20,0	44,4	18,2	33,3
Регуляция молекулярных функций	5,0	—	13,2	20,0	—	9,1	6,7
Структурная молекулярная активность	14,0	—	7,9	—	11,1	27,3	—
Регуляция транскрипции	1,0	—	—	—	—	9,1	—
Транспортная активность	2,0	—	—	—	11,1	—	—
Молекулярная адапторная активность	—	—	2,6	—	11,1	—	—
Молекулярное преобразование	—	16,7	2,6	—	—	—	—
АТФ-зависимая активность	2,0	—	—	—	—	—	6,7

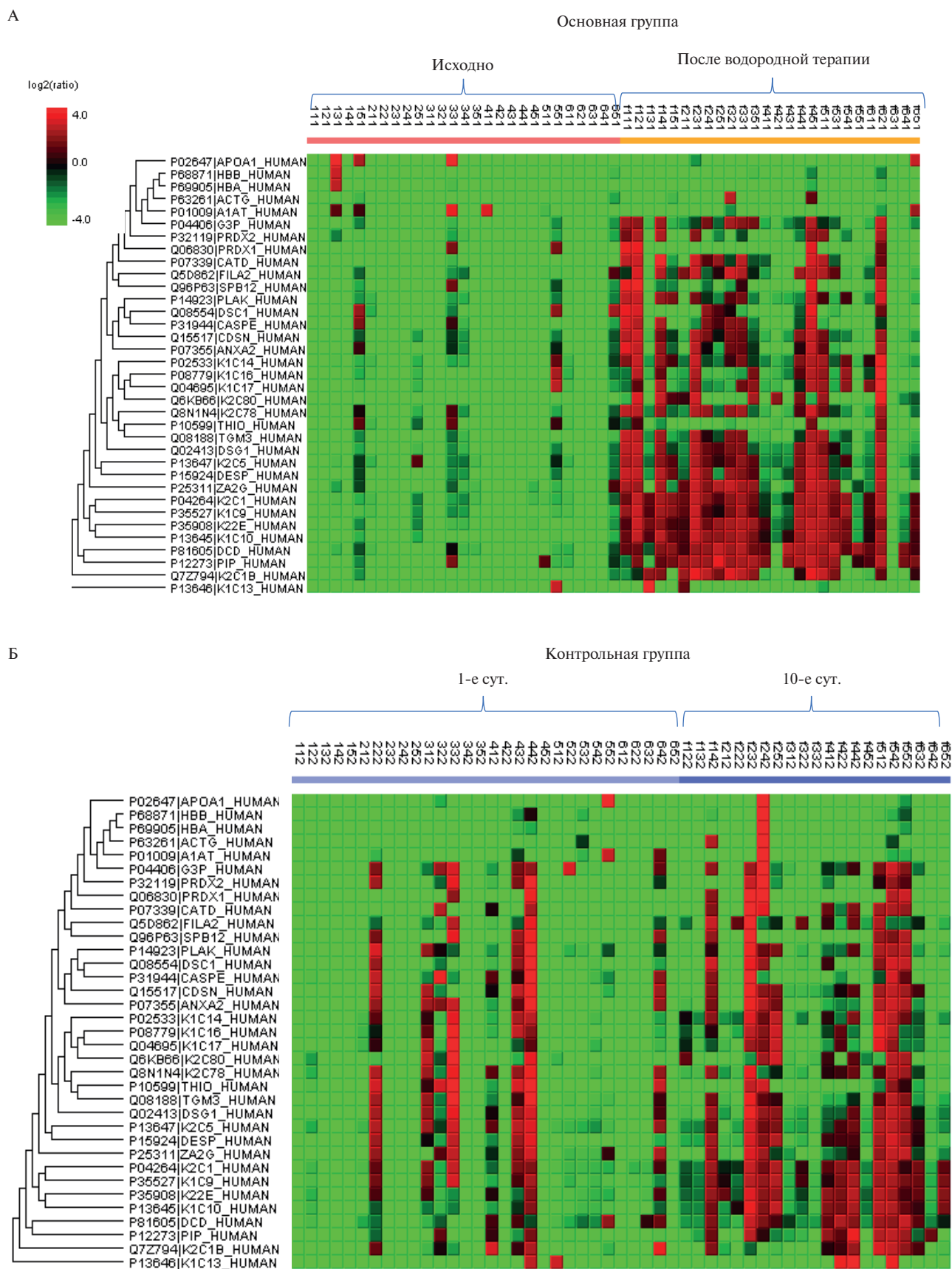


Рис. 2 Иерархическая кластеризация белков со значительно изменяющимися концентрациями при проведении сравнительного полуквантитативного анализа протеомных профилей КВВ в основной (А) и контрольной (Б) группах.

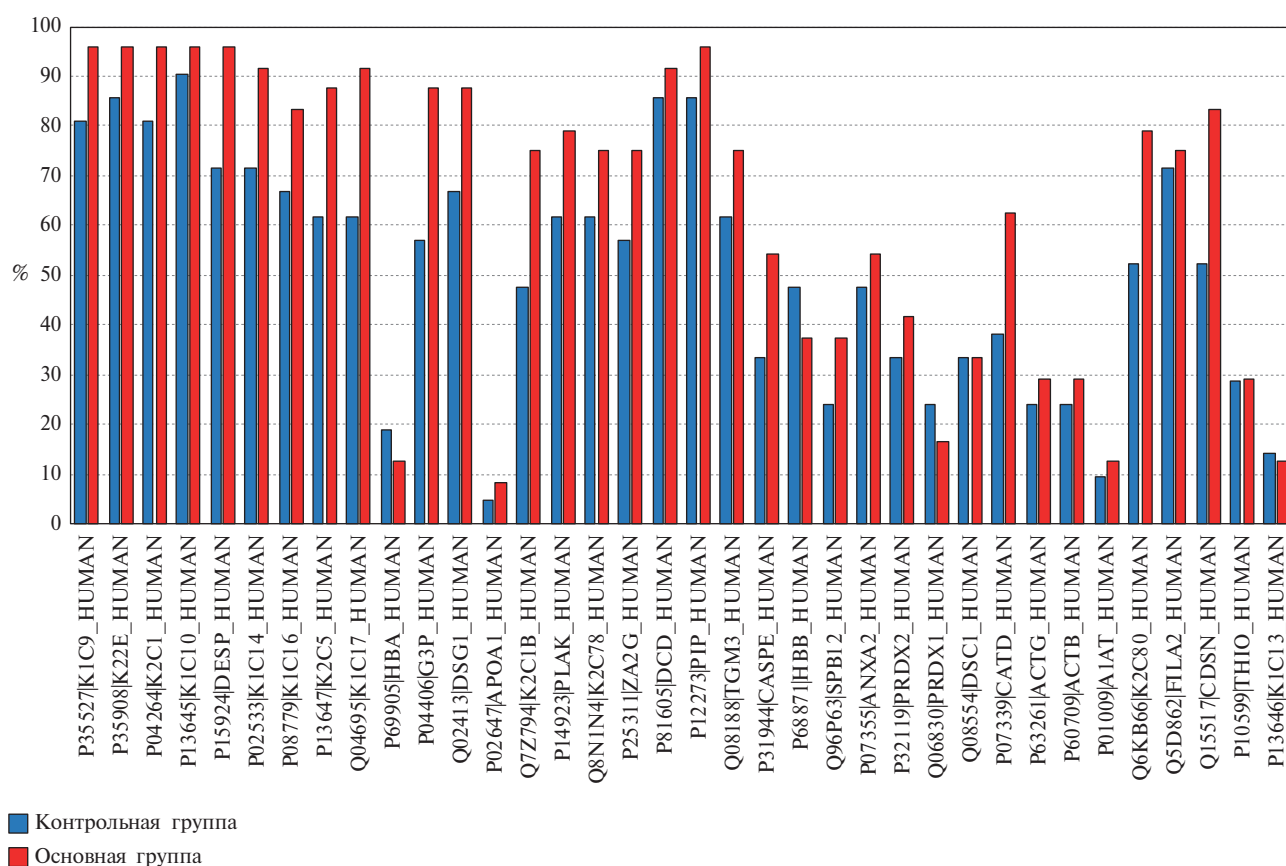


Рис. 3 Доля лиц, у которых относительная концентрация белка увеличилась в ходе исследования.

циентов — уровень белка повышен у курильщиков (проба 331) и пациентов с респираторными патологиями (проба 551 — астма), а также у перенесших COVID-19 в тяжелой степени (проба 151 — длительное течение заболевания).

Тем не менее, количественные изменения 36 белков в совокупности позволили достоверно различить подгруппы до и после прохождения терапии. Результаты, представленные на рисунке 2, отражают более существенное влияние АФВ на количественные изменения ряда белков (рисунок 3 А), чем это имеет место в контрольной группе (рисунок 3 Б). Важно отметить, что среди этих белков есть участники процессов свертывания крови ( $\alpha$ -1-антитрипсин), опосредованного хемокинами и цитокинами воспаления, и ряда сигнальных путей (цитоплазматический актин 2), ответа на окислительный стресс (тиоредоксин), гликолиза (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) и пр. Очевидно, переключения этих процессов играют важную роль на этапе восстановления функций легких при ПКС.

На гистограмме представлена доля пациентов в каждой группе, у которых к концу исследования наблюдалось повышение уровня белков КВВ; при этом в группе, получающей водородную терапию, таких пациентов было больше (рисунок 3).

В таблице 3 значимо меняющиеся белки распределены по функциональным группам. Самые большие группы — это структурные и защитные белки. Их концентрация значительно увеличилась в основной группе.

Важно отметить увеличение частоты встречаемости и концентрации в основной группе белка тиоредоксина, выполняющего роль защиты клеток от окислительного стресса путем детоксикации перекисей, а также белка аннексина А2.

### Обсуждение

В последние десятилетия в комплексном лечении больных с респираторными патологиями хорошо себя зарекомендовала терапия медицинскими газами [12-14], в частности водородная терапия — ингаляция смесью кислорода и водорода. Имеются сообщения о влиянии АФВ на активность противовоспалительных медиаторов, сложилось предварительное впечатление о спаринг-эффекте водорода и при ингаляции кислородом [6].

Уже в самом начале пандемии были получены данные о преимущественном распространении SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2) респираторным путем, в виде аэрозолей, т.е. ингаляционный путь распространения превалировал над желудочно-ки-

шечным, кожным и т.д.<sup>2</sup>. К числу этих аэрозолей, в частности, относится КВВ. В связи с этим многие исследования были посвящены изучению возможности детектирования вирусных частиц в КВВ, особенно ввиду высокого процента ложноотрицательных результатов анализа ротоглоточной среды у клинически положительных пациентов с COVID-19 [15-17].

Выдыхаемый воздух содержит и другие маркеры COVID-19, подходящие для его диагностики: например, в предоперационный период часто проводят детекцию летучих органических соединений с помощью электронного носа [18].

Анализ полученных результатов по белковому составу КВВ показал, что АФВ способствует увеличению доли белков с каталитической, молекулярно-адапторной и транспортной активностями и снижению доли связывающих белков. В то же время, при проведении только стандартной терапии в контрольной группе, наоборот, увеличивается доля связывающих белков и, кроме того, увеличивается аденозинтрифосфат (АТФ)-зависимая активность. Анализ биологических путей подчеркивает существенную разницу в меняющихся физиологических процессах у пациентов двух групп: в контрольной группе сохраняется существенная роль процессов свертывания (фактор свертывания XIII), интегринового и апоптотического сигналинга (филамин-В и родственный белок теплового шока 71 кДа), проявляется пуриновый биосинтез *de novo* (митохондриальная гуанозинтрифосфат:аденозинмонофосфат фосфотрансфераза АКЗ); тогда как при ингаляции АФВ важную роль играет сигналинг, опосредованный рецепторами гастрина и холицистокинина (кластерин), активизируются цикл трикарбонных кислот и синтез АТФ (митохондриальные фумаратгидролаза и АТФ-синтаза), метаболизм пурина и проявляются пути спасения аденина и гипоксантина, ксантина и хинина (пурин-нуклеозидфосфорилаза). Таким образом, качественный анализ показывает существенное влияние терапии АФВ на протеом КВВ и отражает характерные изменения физиологических путей с существенным снижением доли провоспалительных процессов, которое происходит в большей степени, чем в контрольной группе, где применяли стандартную терапию.

Представляется немаловажным присутствие среди значимо меняющихся белков большого числа кератинов, что заслуживает дополнительного обсуждения. В предыдущих работах было показано, что цитоскелетные кератины являются основными белковыми компонентами КВВ как у курьщиков, так и у некурящих здоровых людей [19].

Таблица 3

## Распределение идентифицированных белков по функциональным группам

Структурные белки		
№	Белок	ID и ген белка
1	Keratin type I cytoskeletal 9	P35527 K1C9_Human
2	Keratin type I cytoskeletal 10	P13645 K1C10_Human
3	Keratin type I cytoskeletal 13	P13646 K1C13_Human
4	Keratin type I cytoskeletal 14	P02533 K1C14_Human
5	Keratin type I cytoskeletal 16	P08779 K1C16_Human
6	Keratin type I cytoskeletal 17	Q04695 K1C17_Human
7	Keratin type II cytoskeletal 1	P04264 K2C1_Human
8	Keratin type II cytoskeletal 1b	Q7Z794 K2C1b_Human
9	Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal	P35908 K22E_Human
10	Keratin type II cytoskeletal 5	P13647 K2C5_Human
11	Keratin type II cytoskeletal 78	Q8N1N4 K2C78_Human
12	Keratin type II cytoskeletal 80	Q6KB66 K2C80_Human
13	Desmoplakin	P15924 DESP_Human
14	Decmoglein-1	Q02413 DDSG1_Human
15	Desmocollin-1	Q08554 DSC1_Human
16	Junction plakoglobin	P14923 PLAK_Human
17	Filaggrin-2	Q5D862 FLG2_Human
Сократительные белки		
18	Actin cytoplasmic 2	P63261 ACTG_Human
19	Actin cytoplasmic 1	P60709 ACTB_Human
Транспортные белки		
20	Apolipoprotein A-I	P02647 APOA1_Human
21	Hemoglobin subunit $\alpha$	P69905 HBA_Human
22	Hemoglobin subunit $\beta$	P68871 HBB_Human
Ферменты		
23	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406 G3P_Human
24	Prolactin-inducible protein	P12273 PIP_Human
25	Protein-glutamine gamma-glutamyl-transferase E	Q08188 TGM3_Human
26	Caspase-14	P31944 CASPE_Human
27	Cathepsin D	P07339 CATD_Human
Защитные белки		
28	Corneodesmosin	Q15517 CDSN_Human
29	Dermcidin	P81605 DCD_Human
30	$\alpha$ -1-antitrypsin	P01009 A1AT_Human
31	Serpin B12	Q96P63 SPB12_Human
32	Annexin A2	P07355 ANXA2_Human
33	Thioredoxin	P10599 THIO_Human
34	Peroxiredoxin-1	Q06830 PRDX1_Human
35	Peroxiredoxin-2	P32119 PRDX2_Human
36	Zinc- $\alpha$ -2-glycoprotein	P25311 ZA2G_Human

Согласно каталогу белков человека, цитокератины СК 1, 2, 9 и 10 — эпидермального происхождения, поэтому считается, что данные белки вносятся при пробоподготовке или имеют экзогенное происхождение, т.е. не относятся к белкам дыхательных путей [20]. В предыдущем исследовании выдвинуто предположение, что эти экзогенные кератины

<sup>2</sup> <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html>. 06.07.2021.



в КВВ являются свободно циркулирующими белками воздуха [19].

Кератины также являются основными структурными белками в эпителиальных клетках, повышенная секреция кератинов у пациентов после водородной терапии обусловлена, по-нашему мнению, освобождением респираторного тракта от поврежденного эпителия.

Из некератиновых белков наиболее часто в КВВ встречается дермцидин — белок-антибиотик, обладающий антибактериальной и протеолитической активностью. Известно, что дермцидин секретируется потовыми железами человека [21], экспрессия дермцидина наблюдается и во многих других тканях, включая респираторный тракт.

Содержание защитного белка аннексина А2 увеличивается в группе после водородной терапии. Этот белок имеет решающее значение для фибринолиза в легких, действуя как корецептор, который активирует эндогенный тканевый активатор плазминогена для лизиса тромбов и стимуляции клиренса фибрина. Аннексин А2 способствует эластичности легких, а также участвует в стабилизации и восстановлении клеточных мембран клеток легочного эпителия, тем самым предотвращая апоптоз [22].

## Литература/References

1. Ballering AV, van Zon SKR, olde Hartman TC, et al. Persistence of somatic symptoms after COVID-19 in the Netherlands: An observational cohort study. *Lancet*. 2022;400:452. doi:10.1016/S0140-6736(22)01214-4.
2. Sudre CH, Murray B, Varsavsky T, et al. Attributes and predictors of long COVID. *Nat Med*. 2021;27:626-31. doi:10.1038/s41591-021-01292-y.
3. Shogenova LV, Truong TT, Kryukova NO, et al. Hydrogen inhalation in rehabilitation program of the medical staff recovered from COVID-19. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(6):2986. (In Russ.) Шогенова Л.В., Чьонг Тхи Тует, Крюкова Н.О. и др. Ингаляционный водород в реабилитационной программе медицинских работников, перенесших COVID-19. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(6):2986. doi:10.15829/1728-8800-2021-2986.
4. Erlich JR, To EE, Liang S, et al. Targeting Evolutionary Conserved Oxidative Stress and Immunometabolic Pathways for the Treatment of Respiratory Infectious Diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2020;32(13):993-1013. doi:10.1089/ars.2020.8028.
5. Moon DH, Kang DY, Haam SJ, et al. Hydrogen gas inhalation ameliorates lung injury after hemorrhagic shock and resuscitation. *J Thorac Dis*. 2019;11(4):1519-27. doi:10.21037/jtd.2019.03.23.
6. Zheng ZG, Sun WZ, Hu JY, et al. Hydrogen/oxygen therapy for the treatment of an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: results of a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group controlled trial. *Respir Res*. 2021;22:149. doi:10.1186/s12931-021-01740-w.
7. Pierucci P, Vaschetto R, Carpagnano GE. Is it feasible to collect exhaled breath condensate in COVID-19 patients undergoing noninvasive ventilatory support? *ERJ Open Res*. 2021;7:00071-2021. doi:10.1183/23120541.00071-2021.
8. Zakharova N, Kozyr A, Ryabokon A, et al. Mass spectrometry based proteome profiling of the exhaled breath condensate for lung cancer biomarkers search. *Expert Rev Proteomics*. 2021;18(8):637-42. doi:10.1080/14789450.2021.1976150.
9. Lacombe M, Marie-Desvergne C, Combes F, et al. Proteomic characterization of human exhaled breath condensate. *J Breath Res*. 2018;12:021001. doi:10.1088/1752-7163/aa9e71.
10. Kononikhin AS, Brzhozovskiy AG, Ryabokon AM, et al. Proteome Profiling of the Exhaled Breath Condensate after Long-Term Spaceflights. *Int J Mol Sci*. 2019;20:4518. doi:10.3390/ijms20184518.
11. Mi H, Ebert D, Muruganujan A, et al. PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Res*. 2021;49:394-403. doi:10.1093/nar/gkaa1106.
12. Zafonte RD, Wang L, Arbelaez CA, et al. Medical Gas Therapy for Tissue, Organ, and CNS Protection: A Systematic Review of Effects, Mechanisms, and Challenges. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(13):e2104136. doi:10.1002/adv.202104136.
13. Shogenova LV, Petrikov SS, Zhuravel SV, et al. Thermal Helium-Oxygen Mixture as Part of a Treatment Protocol for Patients with COVID-19. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2020;75(5S):353-62. (In Russ.) Шогенова Л.В., Петриков С.С., Журавель С.В. и др. Термическая гелий-кислородная смесь в лечебном алгоритме больных с COVID-19. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2020;75(5S):353-62. doi:10.15690/vramn1412.
14. Varfolomeev SD, Panin AA, Bykov VI, et al. Thermovaccination — thermoheliox as a stimulator of the immune response. Kinetics of the synthesis of antibodies and C-reactive protein in coronavirus infection. *Chem-Biol Interact*. 2021;334:109339. doi:10.1016/j.cbi.2020.109339.

## Заключение

Результаты проведенного исследования группы медицинских сотрудников, перенесших COVID-19 и включенных в исследование в связи с ПКС, позволяют заключить, что применение водородной терапии способствует переключению ряда физиологических процессов, что может влиять на успех восстановительного лечения при ПКС. В частности, полученные результаты указывают на активацию водородной терапией аэробного синтеза АТФ в митохондриях, что хорошо соотносится с выявленным лабораторными исследованиями снижением уровня лактата (отражающим снижение анаэробного гликолиза) в крови исследованных пациентов [20]. Представляется важным, что данная терапия может тормозить провоспалительные процессы, негативно влияя на процессы свертывания и сигнальные пути интегринов и апоптоза, и, кроме того, активировать защитные пути, цикл трикарбонных кислот, FAS-сигналинг и метаболизм пурина, что может быть важным для эффективного восстановления после перенесенного COVID-19.

**Отношения и деятельность:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

15. Ryan DJ, Toomey S, Madden SF, et al. Use of exhaled breath condensate (EBC) in the diagnosis of SARS-COV-2 (COVID-19). *Thorax*. 2021;76:86-8. doi:10.1136/thoraxjnl-2020-215705.
16. Sawano M, Takeshita K, Ohno H, et al. A short perspective on a COVID-19 clinical study: 'diagnosis of COVID-19 by RT-PCR using exhale breath condensate samples'. *J Breath Res*. 2020;14:042003. doi:10.1088/1752-7163/abb99b.
17. Loconsole D, Paola P, Daniele C, et al. Exhaled breath condensate (EBC) for SARS-CoV-2 diagnosis still an open debate. *J Breath Res*. 2022;16:027101. doi:10.1088/1752-7163/ac4dd3.
18. Wintjens A, Hintzen KFH, Engelen SME, et al. Applying the electronic nose for pre-operative SARS-CoV2 screening. *Surg Endosc*. 2020;2:1-8. doi:10.21203/rs.3.rs-91868/v1.
19. Kurova V, Anaev E, Kononikhin A, et al. Proteomics of exhaled breath: methodological nuances and pitfalls. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(6):706-12. doi:10.1515/CCLM.2009.166.
20. Hoffmann H, Tabaksblat L, Enghild J, et al. Human skin keratins are the major proteins in exhaled breath condensate. *Eur Respir J*. 2008;31(2):380-4. doi:10.1183/09031936.00059707.
21. Schittek B, Hipfel R, Sauer B, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*. 2001;2(12):1133-37. doi:10.1038/ni732.
22. Zuniga M, Gomes C, Carsons SE, et al. Autoimmunity to annexin A2 predicts mortality among hospitalised COVID-19 patients. *Eur Respir J*. 2021;58:210098. doi:10.1183/13993003.00918-2021.