

МЕТАБОЛОМНЫЙ ПОДХОД В ДИАГНОСТИКЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Анохина Т.Н.¹, Анаев Э.Х.¹, Чучалин А.Г.¹, Ревельский А.И.², Родионов А.А.², Ревельский И.А.², Алексеев Д.В.³, Кудрявцев В.Б.³

¹ФГУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России (105077, г.Москва, ул. 11-я Парковая, д.32, тел.: (495) 4655384. E-mail: dr-anokhina@yandex.ru);

²Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова (119991, г.Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.3);

³Механико-математический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова (119991, г.Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д.1, Главное здание).

METABOLOMIC APPROACH IN THE DIAGNOSIS OF ASTMA AND COPD

Anokhina T.N.¹, Anaev E.Kh.¹, Chuchalin A.G.¹, Revelsky A.I.², Rodionov A.A.², Revelsky I.A.², Alexeev D.V.³, Kudriavtsev V.B.³

Research Institute of Pulmonology FMBA Russia

Faculty of Chemistry, MV Lomonosov Moscow State University

Mechanics and Mathematics, Lomonosov Moscow State University

Summary

The search for new non-invasive techniques and biomarkers for the diagnosis of asthma and COPD is a topical problem of modern respiratory medicine.

Objective: To assess the potential of metabolomic approach in exhaled breath condensate (EBC) analysis in the diagnosis of asthma and COPD.

Methods: 20 patients with COPD exacerbation (age $66,5 \pm 8,5$ years; $FEV_1 - 57,3 \pm 22,9\%$ pred), 20 patients with asthma exacerbation (age $50,2 \pm 13,2$ years; $FEV_1 - 71,4 \pm 20,7\%$ pred) and 30 healthy nonsmoking volunteers (age $25,4 \pm 9,6$ years, $FEV_1 - 98,4 \pm 6,8\%$ pred) were enrolled in cross-sectional study. EBC was collected using ECoScreen. Testing for SvOC with different polarity in EBC was conducted by gas chromatography/mass-spectrometry (GC/MS) method. The collected data were analyzed using an algorithm based on linear methods of pattern recognition theory.

Results: There was detected more than 100 of various semi-volatile organic compounds (SvOC) in ultra-low concentrations in EBC from patients with asthma, COPD and healthy subjects. 33 SvOC were identified. 9 SvOC (2,3-dihydro-1-H-inden-1-on, ethyl citrate, decanol-1, 2-phenoxyethanol and others) have been deemed the most appropriate for solving recognition problem. Mathematical analysis of the available data enabled distinguishing healthy volunteers

from the patients with asthma with reliability of 75%, healthy subjects from COPD patients – 85%, and asthma patients from COPD patients – 83%.

Conclusion: Metabolomic approach in EBC analysis help us to diagnose asthma and COPD.

Key words: biomarkers, exhaled breath condensate, semi-volatile organic compounds, metabolomics, diagnosis, asthma, COPD.

Резюме

Поиск новых неинвазивных методов и биомаркеров для диагностики БА и ХОБЛ является актуальной проблемой современной респираторной медицины.

Цель: Оценить возможность метаболомного подхода при анализе конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) в диагностике бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ).

Методы: В простое поперечное исследование было включено 20 пациентов с обострением ХОБЛ (в возрасте $66,5 \pm 8,5$ лет; $ОФВ_1 - 57,3 \pm 22,9\%$ долж.), 20 пациентов с обострением БА (в возрасте $50,2 \pm 13,2$ лет; $ОФВ_1 - 71,4 \pm 20,7\%$ долж.), 30 здоровых некурящих добровольца (в возрасте $25,4 \pm 9,6$ лет; $ОФВ_1 - 98,4 \pm 6,8\%$ долж.). КВВ собирали с помощью аппарата ECoScreen. Содержание СлОС различной полярности в КВВ определяли методами газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ-МС). Для обработки полученных данных использовали линейные методы теории распознавания образов.

Результаты: В образцах КВВ больных ХОБЛ, БА и здоровых добровольцев было найдено более 100 различных СлОС в ультранизкой концентрации. 33 СлОС было идентифицировано. 9 соединений (2,3-дигидро-1-инден-1-он, этил цитрат, деканол-1, 2-феноксизтанол и др.) обладали наибольшим информационным весом в дифференциальной диагностике групп. Математический анализ полученных данных позволил разделить здоровых и больных БА с надёжностью 75%, здоровых и больных ХОБЛ - с надёжностью 85%, больных БА и ХОБЛ - с надёжностью 83%.

Вывод: Метаболомный подход при анализе КВВ позволяет диагностировать БА и ХОБЛ.

Ключевые слова: биомаркеры, конденсат выдыхаемого воздуха, среднелетучие органические соединения, метаболомика, диагностика, бронхиальная астма, ХОБЛ.

Введение

Метаболомика – постгеномная технология, которая изучает низкомолекулярные метаболические профили, являющиеся конечными продуктами обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме. Целью метаболомного анализа является идентификация и

количественное измерение метаболитов биологического объекта, которые появляются под воздействием различных условий или факторов [1, 2].

Бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) имеют сходные клинические проявления, поэтому диагностика этих заболеваний затруднена [3, 4]. Дифференциальная диагностика БА и ХОБЛ чрезвычайно важна из-за различий в показателях заболеваемости и смертности, клинических исходов, подходах к терапии. Разные механизмы воспалительного процесса при БА и ХОБЛ приводят к продукции различных метаболитов, что создает предпосылки для использования метаболомного анализа в диагностике этих заболеваний.

Материалом для оценки метаболизма в легких может служить конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ) [5]. Известно, что КВВ отражает состав жидкости, покрывающей нижние дыхательные пути [6]. Метаболомный анализ КВВ позволяет выявить биомаркеры, специфичные для тех или иных патологических процессов в легких. Для идентификации и количественного анализа метаболитов используют газо-жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС), ядерно-магнитный резонанс высокого разрешения [7-9]. Эти высокочувствительные методы позволили определить сотни тысяч метаболитов, в том числе различные летучие органические соединения (ЛОС) в выдыхаемом воздухе и КВВ в ультраследовых концентрациях [10, 11]. Предполагается, что анализ среднелетучих органических соединений (СлОС), сконцентрированных в КВВ, может лучше отражать состав выдыхаемых органических соединений по сравнению с анализом выдыхаемого воздуха [12]. Однако на сегодняшний день имеются единичные публикации зарубежных авторов по метаболомному анализу КВВ.

Цель работы:

Оценить возможность метаболомного анализа КВВ для диагностики обструктивных заболеваний органов дыхания.

Материал и методы исследования

В простое поперечное исследование было включено 70 человек в возрасте от 19 до 75 лет. Группы ХОБЛ и БА были отобраны среди пациентов, госпитализированных в стационар с обострением заболевания. Группа ХОБЛ состояла из 20 больных с ранее подтвержденным диагнозом ХОБЛ II и III стадии [4], длительностью заболевания более 5 лет, наличием 2-х и более критериев Anthonisen (усиление одышки, увеличение продукции мокроты и гнойности мокроты). В группу БА были включены 20 пациентов с

ранее подтвержденным диагнозом БА в соответствии с рекомендациями GINA [3], длительностью заболевания не менее 5 лет и симптомами неконтролируемой БА. В исследование не включались больные, принимающие системные глюкокортикоиды, страдающие другими болезнями легких, онкологическими заболеваниями, с тяжелой сопутствующей патологией сердечно-сосудистой системы, органов пищеварения, мочеполовой и нервной системы, сахарным диабетом, злоупотребляющие алкоголем и наркотиками в анамнезе, а также беременные и кормящие грудью женщины. Контрольная группа состояла из 20 здоровых некурящих добровольцев с нормальными показателями функции внешнего дыхания (ФВД), у которых в анамнезе отсутствовали указания на аллергические болезни, хронические заболевания легких, острые респираторные вирусные инфекции в течение последних 2-х месяцев. Характеристика обследованных групп представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика обследованных групп.

	БА	ХОБЛ	Добровольцы
Обследованные (N)	20	20	30
Пол, муж/жен	7/13	15/5	13/17
Возраст (лет)	50,2± 13,2*	66,5± 8,5*	25,4± 9,6
Курящие (N)	6	19	-
Длительность заболевания, лет	16,4± 7,5	11,3± 4,4	-
ОФВ₁, % от должного	71,4± 20,7*	57,3± 22,9*	98,4± 6,8
ФЖЕЛ, % от должного	91,6± 18,8*	102,5± 26,3	104,1± 9,6
ОФВ₁/ФЖЕЛ, % от должного	61,5± 9,6*	53,4± 7,7*	84,5± 2,1
КБД_{ОФВ1}, %	29,5± 10,1*	8,7± 5,1*	3,3± 2,0
SpO₂, %	96,7± 0,86*	93,4± 2,03*	97,6± 0,56
MRC, баллы (0-4)	2,1± 0,8*	2,6± 1,2*	0± 0

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми добровольцами.

Общеклиническое обследование включало: сбор анамнеза заболевания и жизни, изучение жалоб, оценку общего состояния и физикальных данных, а также лабораторно-инструментальные исследования (общий и биохимический анализы крови, общий анализ мочи, общий анализ мокроты, рентгенография грудной клетки, электрокардиография, иммунологический анализ крови, пульсоксиметрия, спиральная компьютерная томография грудной клетки - по показаниям).

Исследование ФВД проводили с помощью прибора Master Screen Spiro (Erich JAGER, Германия) в соответствии с рекомендациями Европейского респираторного общества (ERS). Определяли общепринятые показатели легочной вентиляции, статические и динамические объемы. Оценивали объем форсированного выдоха за первую секунду ($ОФВ_1$), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), $ОФВ_1/ФЖЕЛ$, прирост $ОФВ_1$ на ингаляцию 400 мкг сальбутамола. Полученные результаты сопоставляли с должными величинами, вычисленными по формулам, предложенным консенсусом ERS и ATS (Американского торакального общества) [13], а их интерпретацию осуществляли с использованием методических рекомендаций [14]. Пиковую скорость выдоха (ПСВ) оценивали пикфлоуметром Personal Best (Respironics, США).

Оценка клинических симптомов БА и ХОБЛ, таких как кашель, количество мокроты, приступы удушья, хрипы в груди проводилась по 4-х бальной шкале: 0 – нет симптома, 1 – слабая выраженность, 2 – умеренная выраженность, 3 – сильная выраженность симптома. Количественная оценка одышки у больных ХОБЛ и БА проводилась по шкале Medical Research Council Dyspnea Scale (MRC), в которой: 0 баллов – одышка не беспокоит, за исключением очень интенсивной нагрузки; 4 балла – одышка при минимальной физической активности.

Сбор КВВ проводили с помощью аппарата ECoScreen (Erich JAEGER, Германия), стандартизованным методом с использованием носового зажима в течение 10 минут. Для стандартизации сбора КВВ использовали прибор ECoVent (Erich JAEGER, Германия), который позволяет контролировать такие показатели, как время, объем выдыхаемого воздуха, частоту дыхания, пиковую скорость выдоха, минутную вентиляцию, жизненную емкость легких во время процедуры. КВВ всем обследуемым собирали однократно, пациентам с обострением БА и ХОБЛ в первый-второй день поступления в стационар. Собранные образцы КВВ до проведения анализов хранили в морозильнике при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более одного месяца.

Анализ СлОС в КВВ проводили на кафедре аналитической химии МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством доктора химических наук, профессора И.А. Ревельского. С этой целью был разработан способ определения СлОС различной полярности в водных растворах, основанный на жидкостной экстракции с предварительным высаливанием, отборе пробы экстракта и ее концентрировании с удалением органического растворителя вне аналитической системы в присутствии сорбента. В дальнейшем проводили термодесорбцию и анализ концентрата КВВ методами газовой хроматографии - масс-спектрометрии (ГХ-МС). Пределы обнаружения составили величины порядка 10^{-8} – $10^{-6}\%$.

Идентификацию СлОС в КВВ проводили путем сравнения с масс-спектрами веществ из библиотеки NIST-2005.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 for Windows. Все численные данные представлены как $\text{mean} \pm \text{SD}$ (среднее значение $\pm$ среднее квадратичное отклонение). Достоверность различий одноименных показателей внутри одной группы определяли при помощи парного t-критерия. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Обработку полученного массива данных по СлОС проводили сотрудники кафедры математической теории интеллектуальных систем механико-математического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (руководитель - заведующий кафедрой, академик РАЕН, доктор физико-математических наук, профессор В.Б. Кудрявцев) с использованием разработанного ими алгоритма, основанного на линейных методах теории распознавания образов.

Результаты и обсуждение

Анализ различных ЛОС выдыхаемого воздуха и КВВ вызывает интерес у многих исследователей. Эти вещества являются продуктами метаболизма клеток в дыхательных путях. Еще в 1908 г. *A. Garrod* предположил, что патологические состояния в организме человека могут быть отражены в характерных изменениях профилей ЛОС в биологических жидкостях [15]. Такие диагностические подходы, как геномика, протеомика и метаболомика, позволяют проводить оценку профилей биомаркеров и формировать «отпечаток» заболевания [16]. Подобный подход может быть применен не только к сыворотке крови [17] или бронхоальвеолярной лаважной жидкости [18], но и к выдыхаемому воздуху и КВВ («брифтеомика»).

В нашей работе впервые в России был проведен метаболомный анализ КВВ для диагностики БА и ХОБЛ. Были обследованы пациенты с ранее подтвержденным диагнозом ХОБЛ и БА, которые длительное время наблюдались в ФГУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России. Здоровый контроль был значимо моложе больных БА и ХОБЛ. Ранее проведенный анализ молодых (27 ± 6 лет) и старших (57 ± 7 лет) возрастных групп здоровых добровольцев, показал отсутствие влияния возраста на состав выдыхаемых ЛОС [19].

В нашем исследовании в образцах КВВ здоровых людей, больных БА и ХОБЛ было обнаружено присутствие большого числа органических соединений, содержащихся на уровне 10^{-8} – $10^{-6}\%$, относящихся к различным классам: органические кислоты, спирты, кетоны, альдегиды и др. Пределы обнаружения СлОС рассчитывали по масс-хроматограммам наиболее интенсивных ионов. Регистрацию масс-спектров проводили в

режиме полного ионного тока. Пример ГХ-МС – анализа экстракта КВВ и растворителя представлен на рис.

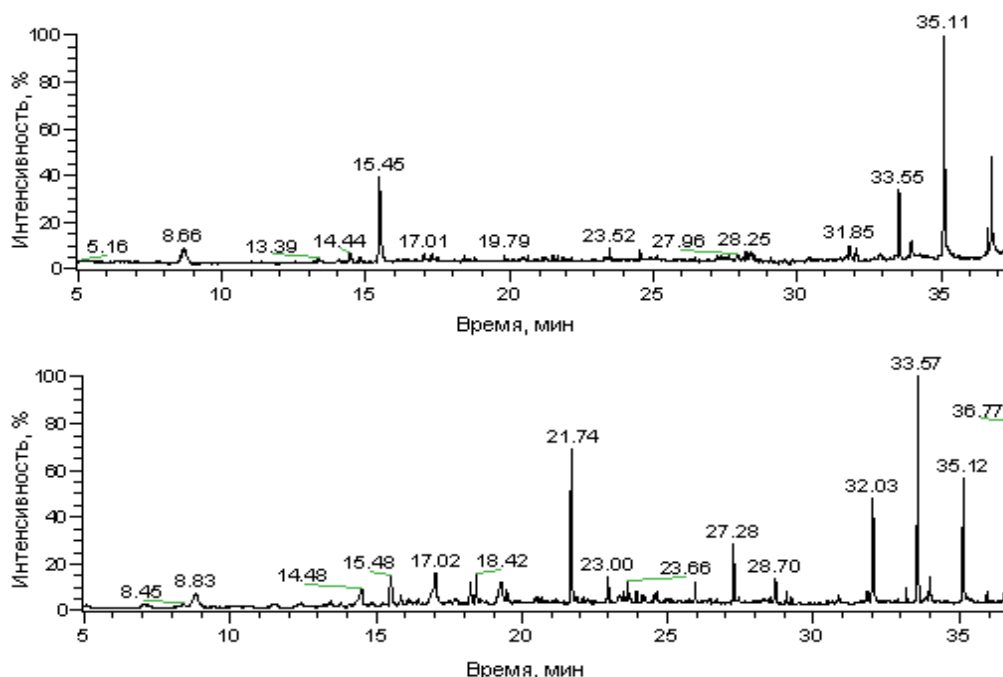


Рис. Хроматограммы растворителя (вверху) и экстракта из КВВ (внизу).

Было идентифицировано 33 СлОС (таблица 2), ещё 11 веществ характеризовались достаточно интенсивным сигналом, стабильным масс-спектром и временем удерживания, однако идентификация по библиотеке масс-спектров оказалась невозможной. Проведено сравнение частот обнаружения и диапазонов значений аналитического сигнала 40 СлОС в КВВ по трем группам: здоровые, ХОБЛ и БА. Большинство веществ из выделенного набора присутствовало практически во всех образцах КВВ каждой группы. Исключение составляют деканол-1, 2-феноксизтанол, никотин, циклододекан, 3-гидрокси-2,4,4-триметилпентиловый эфир 2-метилпропановой кислоты, ундекановая кислота. Частота обнаружения 2-феноксизтанола в КВВ у больных ХОБЛ была значимо реже по сравнению с больными БА и здоровыми. Деканол-1 в образцах КВВ больных БА определялся реже, чем у здоровых и больных ХОБЛ. Концентрация каждого вещества от образца к образцу менялась в пределах 1-3-х порядков. Наименьшие диапазоны значений аналитического сигнала по всем группам обследованных были у деканала, циклододекана и трибутилфосфата, а наибольшие - у фенола, индола и этил цитрата. Наиболее представительную группу, среди обнаруженных в КВВ соединений, составляют 12 насыщенных жирных кислот.

Таблица 2. Вещества, идентифицированные в КВВ, их времена удерживания, результаты поиска по библиотеке масс-спектров NIST.

Название вещества	Время удерживания, мин	Результаты сравнения с масс-спектрами из библиотеки NIST-2005	
		Прямой поиск	Обратный поиск
Фенол	6,5	906	912
Гексановая кислота	8,6	805	861
Бензиловый спирт	10,0	939	946
Гептановая кислота	11,6	766	825
2-этилгексановая кислота	12,3	821	852
Нонаналь	13,3	671	815
Ментол	13,4	919	920
Октановая кислота	14,6	855	889
Деканол-1	15,9	796	828
Деканаль	16,1	813	847
2-феноксизтанол	16,4	905	927
Хинолин	16,7	682	876
Нонановая кислота	17,1	842	843
Индол	18,4	801	871
Никотин	19,1	821	854
Декановая кислота	19,3	779	806
2.3-дигидро-1-Н-инден-1-он	19,6	574	805
Бутоксизтоксизтилацетат	20,3	714	815
Циклододекан	20,6	898	913
3-гидрокси-2,4,4-триметилпентиловый эфир 2-метилпропановой кислоты	20,7	665	739
Ундекановая кислота	21,3	774	770
Додекановая кислота	21,4	837	899
Триацетин	24,0	781	894
Бензофенон	26,4	792	892
Тетрадекановая кислота	27,3	726	776
Трибутилфосфат	28,5	720	853
Метил дигидрожасмонат	28,7	798	846
Пентадекановая кислота	29,1	670	800
Этил цитрат	29,3	898	903
Гексадекановая кислота	30,9	851	856
Октадекановая кислота	34,2	866	869
Этилен брассилат	34,3	816	850
7,9-ди-терт-бутил-1-оксаспиро(4,5)дека-6,9-диен-2,8-дион	36,0	869	875

В результате обработки массива данных с использованием методов компьютерной математики было выявлено 9 веществ из 40 СЛОС, которые имели наибольший информационный вес (9-33%) при решении задачи распознавания обследованных групп. В

случае «здоровые – ХОБЛ» это были вещества под номерами 5 и 9 (из неидентифицированных), 2,3-дигидро-1-Н-инден-1-он и этил цитрат. В случае «здоровые – БА» – вещества под номерами 2, 3, 7 и деканол-1. В случае «БА – ХОБЛ» — вещество 2, деканол-1 и 2-феноксиэтанол.

Применение алгоритма, основанного на линейных методах теории распознавания образов, выявило, что здоровых и больных БА можно различить с надежностью 75%, здоровых и больных ХОБЛ — с надежностью 85%, больных БА и ХОБЛ — с надежностью 83%.

Наши находки можно объяснить тем, что механизмы воспаления в дыхательных путях при БА и ХОБЛ различаются [20-23]. Для воспалительного процесса в дыхательных путях при БА характерно преобладание активации CD4+ Т-клеток, тучных клеток, эозинофилов с повышением цитокинов T₂-пути, таких как ИЛ (интерлейкин)-4, ИЛ-5 и ИЛ-13 [24]. ХОБЛ, с другой стороны, характеризуется CD8+ Т-клетками, повышением числа нейтрофилов и макрофагов, и высоким содержанием медиаторов воспаления, таких как ИЛ-1, ИЛ-8, лейкотриен В₄ и интерферон-γ [25]. Похоже, что эти воспалительные процессы вызывают различные метаболиты, обуславливая появление в КВВ разных СлОС. Предполагают, что эти вещества доставляются из различных по метаболизму и воспалению дыхательных путей, поэтому их анализ в КВВ может приблизить к пониманию патогенеза БА и ХОБЛ. Возможно, что часть СлОС, определяемых в КВВ, имеет не легочное, а системное происхождение [26]. Это согласуется с гипотезой о том, что БА и ХОБЛ имеют системные проявления, и доказывает, что воспалительный процесс при этом затрагивает не только дыхательные пути [27].

Многочисленные исследования выдыхаемого воздуха с использованием прибора Electronic nose (E-nose), который проводит он-лайн анализ ЛОС с помощью 32 нанодатчиков, выявили различия профилей ЛОС у пациентов с патологией легких и у здоровых людей. С помощью E-nose можно различать экс-курильщиков с ХОБЛ от экс-курильщиков с раком легкого [28], а также пациентов со среднетяжелой и тяжелой БА от здоровых людей [19]. Позже появились работы по использованию E-nose в дифференциальной диагностике БА и ХОБЛ [29]. Однако анализ газообразной части выдыхаемого воздуха неадекватно отражает состав смеси выдыхаемых эндогенных соединений в связи с тем, что многие ЛОС и СлОС могут поступать в лёгкие из окружающей среды [12]. Также E-nose не позволяет проводить анализ отдельных компонентов смесей ЛОС [19, 28, 29]. Вследствие этого метаболомный анализ КВВ является наиболее перспективным методом диагностики заболеваний дыхательных путей.

В первом метаболомном исследовании КВВ методами ЯМР-спектроскопии было показано, что данный подход помогает различить здоровых и детей с БА [30]. De Laurentiis G. продемонстрировал, что метаболомный анализ КВВ у взрослых, основанный на ЯМР-спектроскопии, разделяет здоровых и больных ХОБЛ, а также что слюна и КВВ имеют различные метаболические профили [10]. Однако ГХ-МС является более чувствительным методом идентификации и количественного определения метаболитов, чем ЯМР-спектроскопия [7]. Разработанный в нашей работе ГХ-МС анализ КВВ позволил определить СлОС на ультраследовом уровне, а математическая обработка данных, основанная на линейных методах теории распознавания образов, с высокой надежностью разделить здоровых, больных БА и ХОБЛ.

Наши результаты создают предпосылки для проведения дальнейших исследований в этой области. Метаболомный анализ КВВ может быть использован для выделения субфенотипов ХОБЛ и БА, разработки индивидуальных программ лечения, мониторингирования течения заболеваний дыхательных путей, а также раннего выявления патологии у лиц, имеющих факторы риска болезней органов дыхания.

Выводы

1. Разработан способ определения органических соединений различных классов на ультраследовом уровне в КВВ у здоровых, больных БА и ХОБЛ с помощью ГХ-МС.
2. Математические методы обработки полученных данных с применением теории распознавания образов позволяют проводить анализ метаболических профилей КВВ и различать с высокой надежностью здоровых, больных БА и ХОБЛ.
3. Выявленные СлОС могут рассматриваться в качестве биомаркеров БА и ХОБЛ.
4. Метаболомный анализ КВВ («брифтеомика») может быть применен для диагностики обструктивных заболеваний легких.
5. Полученные результаты открывают широкие перспективы для дальнейших исследований.

Литература:

1. Nicholson J.K., Lindon J.C. Systems biology: metabonomics. *Nature* 2008; 455: 1054-1056.
2. Serkova N.J., Niemann C.U. Pattern recognition and biomarker validation using quantitative ¹H-NMR-based metabolomics. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6: 717-731.
3. Bateman E.D., Hurd S.S., Barnes P.J. et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31: 143-178.

4. Rabe K.F., Hurd S., Anzueto A. et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532-555.
5. Carraro S., Giordano G., Stocchero M., Baraldi E. Exhaled breath condensate: metabolomics. *Eur Respir Mon* 2010; 49: 231-236.
6. Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Исследование конденсата выдыхаемого воздуха в пульмонологии (обзор зарубежной литературы). *Пульмонология*. 2002. - №2. - с.57-66.
7. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 2007; 26: 51-78.
8. Coen M., Holmes E., Lindon J.C. et al. NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 9-27.
9. Pan Z., Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387: 525-527.
10. 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 (5): 1175-1183.
11. Sofia M., Maniscalco M., de Laurentiis G. et al. Exploring airway diseases by NMR-based metabonomics: a review of application to exhaled breath condensate. *J Biomed Biotechnol* 2011; Vol. 2011, Article 403260, 7 pages.
12. Родионов А.А., Ревельский А.И., Ревельский И.А. и др. Хроматомасс-спектрометрическое определение среднелетучих органических веществ в конденсате выдыхаемого воздуха. *Масс-спектрометрия*. 2007. – Т.4. -№2. - с.143-148.
13. Miller M.R., Hankinson J., Brusasco V. et al. ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26 (2): 319-338.
14. Функциональная диагностика в пульмонологии: Практическое руководство. Под ред. Чучалина А.Г. - М.: Издательский холдинг «Атмосфера», 2009. – 192 с.
15. 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.
16. Weston A.D., Hood L. Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J Proteome Res* 2004; 3: 179-196.
17. Cramer R. The potential of proteomics and peptidomics for allergy and asthma research. *Allergy* 2005; 60: 1227-1237.
18. Sepper R., Prikk K. Proteomics: is it an approach to understand the progression of chronic lung disorders? *J Proteome Res* 2004; 3: 277-281.

19. 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.
20. Fabbri L.M., Romagnoli M., Corbetta L. et al. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 418-424.
21. Bhattacharya S., Srisuma S., Demeo D.L. et al. Molecular biomarkers for quantitative and discrete COPD phenotypes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40: 359-367.
22. Gibson P.G., Simpson J.L. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it? *Thorax* 2009; 64: 728-735.
23. Brasier A.R., Victor S., Boetticher G. Molecular phenotyping of severe asthma using pattern recognition of bronchoalveolar lavage-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 30-37.
24. Anderson G.P. Endotyping asthma: 2new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet* 2008; 372: 1107-1119.
25. Chung K.F., Adcock I.M. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 2008; 31: 1334-1356.
26. Buszewski B., Keszy M., Ligor T., Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 2007; 21: 553-566.
27. Higashimoto Y., Yamagata Y., Taya S. et al. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: Similarities and differences. *Respirology* 2008; 13: 128-133.
28. Dragonieri S., Annema J.T., Schot R. et al. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer* 2009; 64: 166-170.
29. Fens N., de Nijs S.B., Roldaan A.C. 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.
30. Carraro S., Rezzi S., Reniero F, et al. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 986-990.