

Marjut Vuori

ULOSHENGITYSILMAN PARTIKKELIT - PROTEIINIANALYYSIT

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2025

Marjut Vuori

ULOSHENGITYSILMAN PARTIKKELIT - PROTEIINIANALYYSIT

Kliininen laitos

Kevätlukukausi 2025

Vastuuhenkilöt: Kristiina Malmström, Maria Juusela, Terho Heikkinen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

VUORI, MARJUT: Uloshengitysilman partikkelit - proteiinianalyysit

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 12s, 5 liites.

Lastentautioppi
Helmikuu 2025

Tausta

Tämä tutkimus luonnehtii uloshengitysilman partikkeleita (particles in exhaled air, PExA) lapsilla. Aiemmin vastaavaa tutkimusta ei lasten uloshengitysilman partikkelien osalta ole tehty. Tämä tutkimus keskittyy uloshengitysilman partikkeleiden osalta tarkemmin proteiineihin. Tässä tutkimuksessa tunnistetaan ja kuvataan tärkeimmät proteiinit nestekromatografia-massaspektrometrillä (LCMS) erikseen terveillä sekä astmaa sairastavilla lapsilla, jonka jälkeen saadut havainnot liitetään astmaattiseen tulehdukseen. Hengitysteiden tulehdus sekä tukkeutuminen on tyypillistä astmassa ja erityisesti astmaa sairastavilla lapsilla tulehdus ja tukkeutuminen sijaitsee pienissä hengitysteissä. Tämän tutkimuksen tavoitteena on määrittää uloshengitysilman sisältämät proteiinit terveillä ja astmaa sairastavilla lapsilla ja havaita proteiinien joukosta ne proteiinit, jotka viittaavat mahdollisesti astmaattiseen tulehdukseen.

Menetelmät

Tutkimukseen osallistui yhteensä 49 lasta. Lapsista 31 sairasti astmaa tai tulivat astmaepäilyinä keuhkojentoimintakokeisiin ja 18 oli terveitä. Astmaa sairastavien lasten keski-ikä oli 10,5 vuotta, kun taas terveiden lasten keski-ikä oli 12,5 vuotta. Tutkimuksiin osallistuville tehtiin keuhkojen toimintatutkimukset joko spirometrialla tai impulssioskillometrialla, jonka lisäksi uloshengitysilman partikkelit (PExA) kerättiin ennen (näyte A) ja keuhkoputkia avaavan lääkityksen annon jälkeen (näyte B). Hiukkasten keräämiseen käytettiin erityistä laitteistoa ja hengitystekniikkaa PExA 1.0:lla (PExA, Ruotsi). Proteiinit alkyylikäsiteltiin, eroteltiin nestekromatografialla ja analysoitiin massaspektrometrillä. Hyväksytyjen proteiinien määrät jaettiin yksilöllisillä virtausmäärillä, jotta arvoista saatiin vertailukelpoisia.

Tulokset ja johtopäätökset

Kerätty PExA-massa oli pienempi kuin aikuisilla. Tutkimuksessa käytetyt tekniikat mahdollistivat kuitenkin yli 1300 eri proteiinin määrittämisen 49 lapselta. Terveillä lapsilla havaittiin keuhkoputkia avaavan lääkityksen annon jälkeen enemmän proteiineja. Tässä tutkimuksessa määritetyistä proteiineista tärkeimmät sekä runsaimmin esiintyvät proteiinit olivat albumiini, surfaktantti proteiini A, komplementtifaktorit, immunoglobuliinit ja alfa 1-antitrypsiini. Kyseisten proteiinien on myös aikuisilla havaittu olevan merkittävimmät. Joitakin eroavaisuuksia havaittiin terveiden ja astmaa sairastavien välillä. Keskimääräinen PExA-massa oli merkittävästi suurempi ($p=0,0019$) terveillä koehenkilöillä (29.3 ng) kuin astmaa sairastavilla lapsilla (10.1 ng) näytteessä A. Myös näytteessä B keskimääräinen PExA-massa oli merkittävästi suurempi ($p=0,0016$) terveillä koehenkilöillä (30.4 ng) kuin astmaa sairastavilla lapsilla (10.5 ng). Kaiken kaikkiaan massaspektrometrillä havaittiin 863 proteiinia näytteestä A ja 1181 näytteestä B. Tässä tutkimuksessa selvitettiin jokaista tutkimushenkilöä kohden 50 runsaimmin esiintyvää proteiinia. Näiden 50 runsaimmin esiintyvän proteiinin joukossa oli 130 erilaista proteiinia näytteessä A ja 164 erilaista proteiinia näytteessä B, eli yhteensä 225 erilaista proteiinia, joista 77 proteiinia oli yhteisiä

sekä näytteessä A että näytteessä B. Kymmenen runsaimmin esiintyvää proteiinia olivat albumiini, pinta-aktiivinen proteiini A, dermcidiini, laktoferritiini, komplementti C3, trypsiini 1, kalmoduliinimainen proteiini 5, immunoglobuliini 2 (Ig2), antitrypsiini ja komplementti C4. Proteiinien havaitseminen onnistui jopa näytteistä, joissa oli vain vähän PExA-massaa. Myös immunologisesti mielenkiintoisia proteiineja havaittiin. Proteiinien klusterointianalyysi terveiden ja astmaa sairastavien välillä on tarpeen.

Sisällysluettelo	
Johdanto	1
Tutkimuspopulaatio ja menetelmät	2
Tutkimuspopulaatio	2
Keuhkojen toiminnan mittaukset	3
PExA -menetelmä	3
Nestekromatografia-massaspektrometri (LCMS)	3
Tilastot	3
Tulokset	4
PExA-näytteenotto ja proteiinien kokonaismäärä	4
Proteiinien tunnistaminen	4
Päätelmät	7
PExA-proteiinien määrä	7
Yksittäiset proteiinit	8
Tutkimuksen rajoitukset	9
Johtopäätös	10
Lähteet	11
Liitteet	13

Johdanto

Tämä kirjallinen työ on suomennos vielä helmikuussa 2025 keskeneräisestä artikkelista "Particles in exhaled air – protein analyses". Suomennos on tehty kirjalliseksi osaksi Turun yliopiston Lääketieteellisen tiedekunnan opinnäytetyötä. Opinnäytetyön julkaisemisajankohtana alkuperäistä artikkelia ei ole vielä julkaistu. Opinnäytetyöhön olennaisesti liittyvät posterit löytyvät tämän kirjallisen työn liitteistä, kuten myös kirjoittajan kokonaistyön osuus sekä tiedote PExA-tutkimuksen kliinisestä käytöstä lasten astmassa. Alkuperäisen artikkelin suomennoksen tukena on käytetty tekoälyä Turun yliopiston tekoälylinjauksen mukaisesti (24).

Opinnäytetyön ohjaajina ovat toimineet Kristiina Malmström, Terho Heikkinen sekä Maria Juusela. Juuselan rooli oli toimia PExA-tutkimuksen yhdyshenkilönä sekä kirjoittajan perehdyttäjänä ja ohjaajana PExA-tutkimukseen, -laitteistoon sekä -näytteiden käsittelyyn. Malmströmin rooli oli toimia kirjoittajan lähiohjaajana datan käsittelyvaiheessa sekä tekstin kirjoitusvaiheessa. Heikkisen rooli oli ohjata lopullisen kirjallisen työn valmistumista Turun yliopiston opinnäytetyön ohjeiden mukaisesti.

Astma on krooninen keuhkosairaus, jolle on ominaista hengitysteiden tulehdus ja tukkeutuminen. Astman diagnosointi ja astmaa sairastavien oireiden seuranta perustuvat yhä pääasiassa keuhkojen toiminnan mittauksiin ja oireisiin huolimatta siitä, että astmaattisen tulehduksen biomarkkereiden tutkimus on lisääntynyt.

Hengitysteiden epiteelin ja ulkoisen ympäristön välillä sijaitsee limakalvo, joka on näin ollen kiinnostava kohde astmaattisen tulehduksen tutkimiseen. Uloshengitysilman partikkelit (particles in exhaled air, PExA) -tekniikka mahdollistaa hengitysteiden limakalvolta irtoavien partikkelien keräämisen uloshengitetystä ilmasta. Ilmatiehyet sulkeutuvat sekä uudelleenavautuvat normaalissa uloshengityksessä. (1) Pienten hengitysteiden tukkeutuminen voi puolestaan heikentää näiden ilmatiehyiden uudelleenavautumista ja siten vähentää ulos hengitettävien partikkelien määrää. Kerättyjen hiukkasten määrän (2,3) ja luonteen (4) on ajateltu kuvaavan astmaattista hengitysteiden tulehdusta aikuisilla.

Hengitysteiden limakalvo koostuu pääosin fosfolipideistä (80-90 %) ja proteiineista (10-20 %) (5). Useimmissa PExA-tutkimuksissa on käytetty entsyymivälitteistä immunosorbenttimääritystä (ELISA) muutamien ehdokasproteiinien havaitsemiseksi. Albumiinin pitoisuuksien on havaittu aiemmissa PExA-tutkimuksissa olevan alhaisempia astmaa sairastavilla aikuisilla kuin terveillä koehenkilöillä (6,7). Albumiinin pitoisuuksien erosta huolimatta astmaa sairastavilla on raportoitu sekä korkeampia (7) että alhaisempia (6) surfaktanti A (SP-A) -pitoisuuksia kuin terveillä koehenkilöillä.

Proteiinien analysointi nestekromatografia-massaspektrometrillä (LCMS) mahdollistaa proteiinien objektiivisen tarkastelun. 12 terveen koehenkilön PExA-näytteiden partikkelit tutkittiin LCMS:llä, joka havaitsi näytteissä yhteensä 124 erilaista proteiinia. Näistä 124 proteiinista SP-A:ta oli runsaimmin, minkä jälkeen toiseksi runsaimmin oli seerumin albumiinia. (5) SOMAscan-proteomiikan alusta (SomaLogic Inc.) on uusi menetelmä proteiinien havaitsemiseksi ja se kykenee määrittämään 1300 ihmisen proteiinia. SOMAscanilla analysoiduista 10 terveen koehenkilön ja 20 astmaa sairastavan PExA-näytteistä 80 prosentissa havaittiin yhteensä 207 proteiinia (8). Astmaa sairastavilta

löydettiin runsaasti yhdeksää erilaista solun ulkoisiin vesikkeleihin sekä synnynnäiseen immunitettiin liittyvää proteiinia. PExA- tekniikalla kerätyistä ja SOMAscanilla analysoiduista proteiineista havaittiin proteiinien säätelyhäiriöitä, jotka liittyvät tupakointiin (9). SOMAscanilla havaittiin 203 erilaista proteiinia ilmatiehyistä. Tupakoivilla proteiineja havaittiin ilmenevän vähemmän.

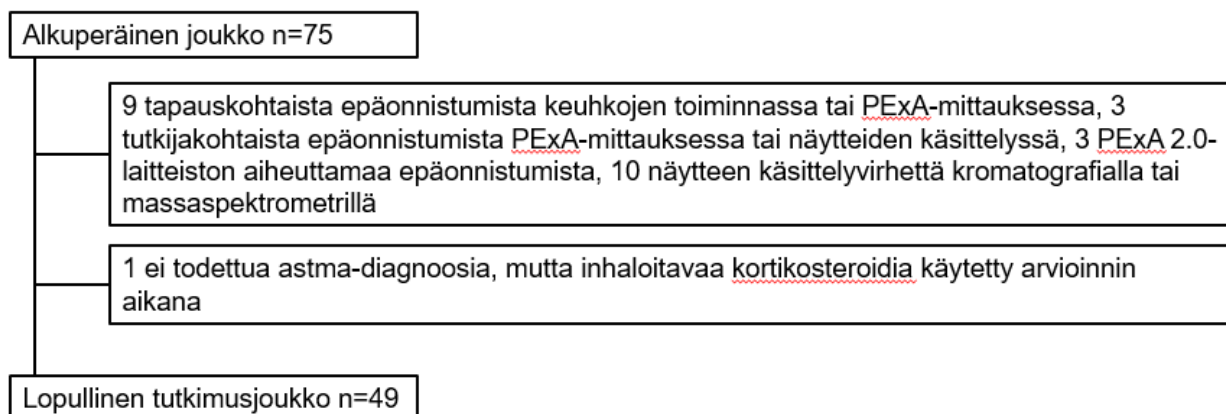
Tässä tutkimuksessa tutkittiin PExA-menetelmän teknistä soveltuvuutta lapsilla (10). Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää uloshengitysilman partikkeleista keskeisimpiä proteiineja terveillä ja astmaa sairastavilla lapsilla ja verrata saatuja tuloksia astmaattiseen tulehdukseen.

Tutkimuspopulaatio ja menetelmät

Tämä tutkimus suoritettiin Pikkujätti Lasten ja nuorten lääkäriasemalla Helsingissä. Hyväksyntä tähän tutkimukseen saatiin Helsingin yliopistollisen sairaalan eettiseltä toimikunnalta. Lisäksi tähän tutkimukseen saatiin kirjallinen suostumus kaikilta koehenkilöiltä sekä alle 15-vuotiaiden lasten huoltajilta. Suostumuksen lisäksi koehenkilöt sekä heidän huoltajansa täyttivät kyselylomakkeen, joka koski todettuja allergioita, edeltävää sairaushistoriaa, altistumista passiiviselle tupakoinnille, ajankohtaisista hengitystieoireista ja edellisen neljän viikon aikana sairastettuja hengitystieinfektioita.

Tutkimuspopulaatio

Tutkimuspopulaatio koostui 49 koehenkilöstä. Koehenkilöt olivat peräisin aikaisemmasta kohortista, johon kuului 75 lasta. PExA tehtiin lisätutkimuksena keuhkojen toiminnan mittausten yhteydessä. Tutkimuspopulaation valinnan vaiheet on kuvattu kuvassa 1. Mukana oli 18 (37 %) tervettä koehenkilöä, joilla ei havaittu poikkeavaa keuhkojen toiminnassa spirometrialla tai impulssioskillometrialla tutkittuna sekä 31 (63 %) lasta, joilla oli diagnosoitu astma tai tulivat astmaepäilyinä keuhkojentoimintakokeisiin (jatkossa "astma"-ryhmä). Terveiden verrokien keski-ikä oli 12.5 vuotta (3,3 sd) ja astmaa sairastavien 10.5 vuotta (2,5 sd). Tutkimuspopulaatiosta 27 (55 %) oli poikia. Atopiaa kuvattiin neljällä (22 %) terveistä verrokeista ja 16 (52 %) astmaa sairastavista.



Kuva 1. Tutkimuspopulaation valinta. PExA, uloshengitysilman partikkelit

Keuhkojen toiminnan mittaukset

Keuhkojen toimintaa tutkittiin spirometrialla (Vyntus SPIRO, Carefusion, Hochberg, Saksa) tai impulssioskillometrialla (Vyntus IOS, Carefusion, Hochberg, Saksa) kansainvälisten ohjeiden mukaisesti (11,12). Kaikilla koehenkilöillä tutkimukset suoritettiin sekä lähtötilanteessa että keuhkoputkia avaavan lääkityksen (katso alla tarkemmin) annon jälkeen. Tutkimuksissa spirometrialla arvioitiin keuhkoputkien ahtautumista eli obstruktiota, keuhkoputkien tilavuutta ja sen mahdollista pienenemistä eli restriktiota ja ventilaatio- eli keuhkotuuletuksen häiriötä. Näitä kuvaamaan spirometriatutkimuksesta kerättiin parametrit maksimaallinen vitaalikapasiteetti FVC, uloshengityksen ensimmäisen sekunnin aikainen tilavuus FEV1 sekä näiden laskennallinen suhde FEV1/FVC. Niille, joille spirometria ei teknisesti onnistunut tehtiin impulssioskillometria, jossa arvioidaan pienten hengitysteiden toimintaa heijastavaa arvoa eli hengitysteiden vastusta 5 Hz taajuudella. Keuhkoputkia avaavaa salbutamolia (Ventoline Evohaler 0.1 mg/annos) annosteltiin Babyhalerin tai Volumaticin (GlaxoSmithKline) avulla. Salbutalomin annostus oli 0.3 mg alle 10-vuotiaille lapsille ja 0.4 mg tätä vanhemmille. Kaikki keuhkojen toimintaparametrit raportoitiin absoluuttisina arvoina ja z-arvoina eli keskiarvopoikkeamina Suomen kansallisten viitearvojen (13–16) mukaan.

PExA -menetelmä

PExA-partikkelit kerättiin suodattimille (10) sekä ennen (näyte A) keuhkoputkia avaavaa lääkitystä että sen jälkeen (näyte B). Kerätyt näytteet säilytettiin - 20 °C: ssa.

Nestekromatografia-massaspektrometri (LCMS)

PExA-suodattimilla olevat proteiinit alkyloitiin ditiotreitoli (DTT)/jodiasetamidi -käsittelyllä ja pilkottiin trypsiinillä rapigestin läsnäollessa. Supernatantti otettiin talteen, kun taas suodatin uutettiin 30 % ja 60 % asetonitriliin kanssa 0.1 % trifluorietikkahappoon (TFA), yhdistetyt supernatantit kuivattiin ja liuotettiin 0.1 % trifluorietikkahappoon. Proteiinit eroteltiin nestekromatografialla (Easy-nLC 1000) ja eluaatti syötettiin Fusion Lumos Tribid - massaspektrometriin, joka oli asetettu DDA-hankintaan MSMS-spektriin proteiinien havaitsemiseksi. Raakadata käsiteltiin Proteome Discoverer 2.2 -ohjelmalla, ja sitä verrattiin kontaminaatioon sekä Swiss-Prot-ihmistietokantaan (versio 20170705). Vain ne proteiinit hyväksyttiin, joilla oli vähintään kaksi tunnistettua peptidiä. Hyväksytyjen proteiinien määrät normalisoitiin yksilöllisten virtaustilavuuksien mukaan ja näin saatu osamäärä jaettiin vielä tuhannella ennen arvojen asettamista logaritmiselle asteikolle. Lisäksi jokaista koehenkilöä kohden määritettiin 50 runsaimmin esiintyvää proteiinia jatkotutkimuksia varten.

Tilastot

Terveiden koehenkilöiden ja astmaa sairastavien lasten välisen eron arvioimiseksi käytettiin jatkuvien muuttujien osalta Mann-Whitney'n U-testiä ja Studentin t-testiä, kun taas kategorisille muuttujille määriteltiin Chi-neliö- tai Fisherin testit. Tutkitut muuttujat olivat kahden suodattimen hiukkasmäärät (a_1+b_1), kuten PExA_m ja PExA_{m/V}. Erojen välisten yhteyden arvioimiseksi käytettiin joko Pearsonin tai Spearmanin korrelaatiota normaalin tai ei-normaalin jakauman perusteella. P-arvoa <0.05 pidettiin merkittävänä.

Tilastolliset analyysit suoritettiin SPSS-ohjelmistolla (Windowsin versio 12.0, Chicago, USA) ja StatXact 6 -ohjelmistolla (Cytel Software Corp., MA, USA, 2003).

Tulokset

PExA-näytteenotto ja proteiinien kokonaismäärä

Keskimääräinen PExA-massa sekä uloshengitetyn ilman keskimääräinen tilavuus olivat merkittävästi suuremmat terveillä koehenkilöillä astmaa sairastaviin lapsiin verrattuna sekä näytteessä A että näytteessä B, kuten taulukosta 1 ilmenee. Eri ryhmien välillä ei ollut merkittävää eroa proteiinimäärien keskiarvoissa LCMS:lla tutkittuna.

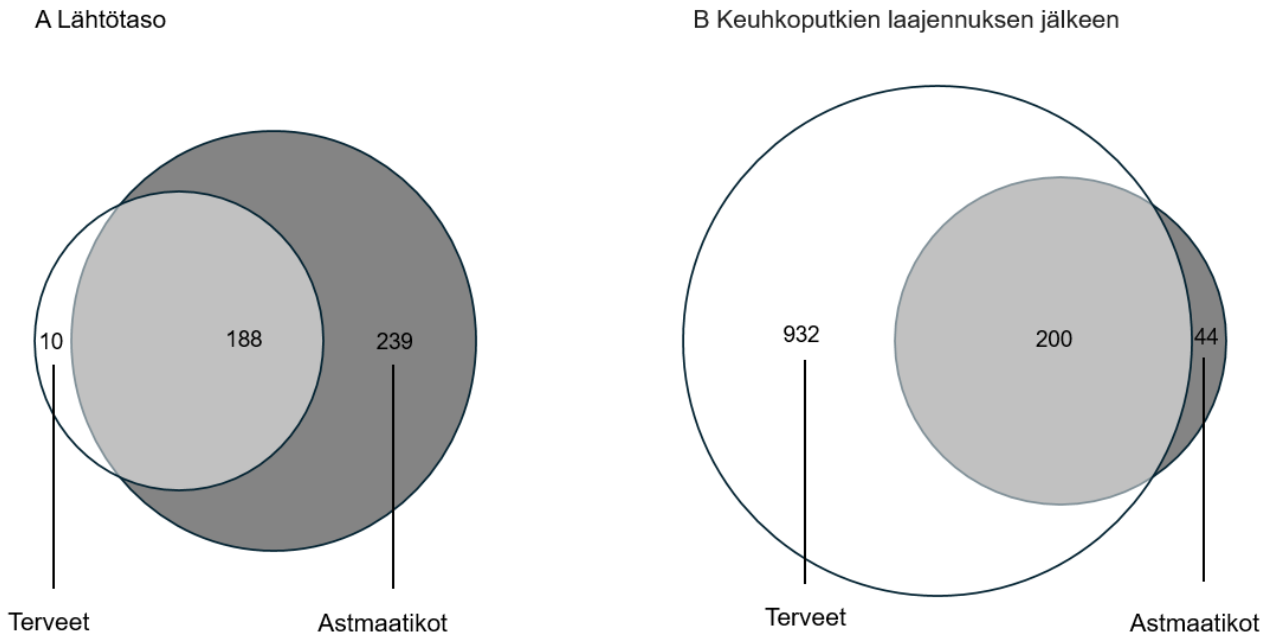
Taulukko 1. PExA-arvot astmaa sairastavilla ja terveillä lapsilla.

	Näyte	Terve	Astmaatikko	p
Massa, ng	A	29.3 (29.8)	10.1 (10.2)	0.0019
	B	30.4 (30.4)	10.5 (9.50)	0.0016
Uloshengitetyn ilman tilavuus, l	A	52.6 (21.4)	33.8 (19.7)	0.0030
	B	45.2 (17.5)	32.3 (15.5)	0.010
Erilaisten proteiinien lukumäärä	A	245 (33.0)	252 (91.0)	0.26
	B	331 (238)	207 (64.0)	0.014
Proteiinien määrä massaspektrometrillä	A	5.30 (5.90)	5.80 (4.10)	0.37
	B	15.4 (42.6)	5.20 (3.10)	0.74

Taulukon 1 luvut on esitetty keskiarvoina ja keskihajontana. Ng, nanogramma; l, litra. Data analysoitiin Mann Whitney U -testillä. Näyte A on otettu lähtötilanteessa ja näyte B keuhkoputkien laajennuksen jälkeen.

Proteiinien tunnistaminen

Tässä tutkimuskohortissa havaittiin kaiken kaikkiaan 1303 erilaista proteiinia. Näytteissä A erilaisten proteiinien kokonaismäärä terveillä koehenkilöillä oli 198 ja astmaa sairastavilla lapsilla proteiinien kokonaismäärä oli 427. Keuhkoputkia avaavan lääkityksen annon jälkeen terveillä koehenkilöillä havaittiin merkittävästi enemmän erilaisia proteiineja (1132) kuin astmaa sairastavilla lapsilla (244), kuvan 2 osoittamalla tavalla. Toisaalta eri proteiinien määrä yksilöä kohti näytteessä A ei eronnut merkittävästi terveillä koehenkilöillä (245) ja astmaa sairastavilla lapsilla (252) ($p=0.258$, Mann-Whitneyn U-testi), kun taas keuhkoputkia avaavan lääkityksen annon jälkeen terveillä koehenkilöillä havaittiin merkittävästi enemmän erilaisia proteiineja (331) yksilöä kohden kuin astmaa sairastavilla lapsilla (207) ($p=0.014$, Mann-Whitneyn U-testi). Iän ja eri proteiinien määrien välillä ei havaittu korrelaatiota.



Kuva 2. PExA- proteiinien määrät lähtötasolla ja keuhkoputkien laajennuksen jälkeen. Lähtötasolla proteiinien kokonaismäärä oli 437 ja keuhkoputkien laajentamisen jälkeen 1176. Mitattujen proteiinien kokonaismäärä lisääntyi merkittävästi keuhkoputkien laajennuksen jälkeen. Terveillä proteiinien määrä lisääntyi merkittävästi keuhkoputkien laajennuksen jälkeen, kun taas astmaatikoilla proteiinien määrä pieneni. Analyysiin hyväksyttiin proteiinit, joissa on enemmän kuin yksi peptidi. Kuvassa terveet on merkitty valkoisella ja astmaatikot tumman harmaalla. Kuvassa vaalean harmaalla on esitetty proteiinit, jotka esiintyvät sekä terveillä että astmaatikoilla.

Koehenkilöitä kohden määritettyjen viidenkymmenen runsaimman proteiinin joukosta löytyi 130 erilaista proteiinia näytteessä A (113 terveillä ja 111 astmaa sairastavilla) ja 164 erilaista proteiinia näytteessä B (130 terveillä ja 133 astmaa sairastavilla). Kaiken kaikkiaan 225 erilaista proteiinia havaittiin ja luokiteltiin eri ryhmiin niiden toiminnan tai alkuperän mukaan: tulehdusproteiineihin, immunoglobuliineihin, entsyymeihin, kuljetusproteiineihin, solunsisäiseen aineenvaihduntaan, soluliikenteeseen, hyytymisjärjestelmään, keratiineihin, tukirankaproteiineihin ja rauhaseritykseen.

Näytteiden A ja B 225: stä erilaisesta proteiinista 77 oli yhteisiä. Näistä yhteisistä proteiineista 30 määrältään runsaimmin esiintynyttä on esitetty suuruusjärjestyksessä taulukossa 2. Albumiinia havaittiin kaikilla kontrolliryhmän koehenkilöillä ja astmaa sairastavilla, kun taas SP-A:ta havaittiin kaikilla kontrolliryhmän koehenkilöillä ja 29:llä (94 %) astmaa sairastavista lapsista. Proteiinien solutukiranka 10, tyypin II keratiinien, dermcidiinin, plakoglobiinin ja suprabasiinin ajatellaan olevan peräisin iholta, limakalvoilta ja hajonneista soluista. Albumiinin sekä SP-A:n määrä korreloi merkittävästi kokonaispartikkelimäärän kanssa ($r=0.603$; $p<0.001$ and $r=0.558$; $p<0.001$, Spearman) sekä normalisoitujen partikkelimäärien osalta ($r=0.653$; $p<0.001$ and $r=0.614$; $p<0.001$, Spearman).

Taulukko 2. PExA-mittauksella havaitut tavallisimmat proteiinit.

Trypsin-1	Desmoglein-1	Alfa-1-antitrypsin
Calmodulin-like-protein 5	Serum albumin	Complement C4-A
Immunoglobulin heavy constant alpha 1	Keratin, type I, cytoskeletal 17	Immunoglobulin lambda constant 2
DENN domain-containing protein 5B	Pulmonary surfactant-associated protein A2	Suprabasin
Coronin-1A	Lactotransferrin	Elongation factor 2
Clusterin	Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Annexin A2
Polymeric immunoglobulin receptor	Complement C3	Immunoglobulin heavy constant gamma 2

Taulukossa 2 on esitetty 21 yleisintä PExA-mittauksella havaittua proteiinia. Iholta, limakalvoilta sekä hajonneista soluista peräisin olevat, kontaminantteina pidetyt proteiinit (Type 1 cytoskeletal 10; Keratin, type I cytoskeletal 9; Keratin, type II cytoskeletal 2 oral; Keratin, type II cytoskeletal 5; Keratin, type I cytoskeletal 16; Keratin, type I cytoskeletal 14; Keratin, type II cytoskeletal 16; Dermcidin; Junktion plakoglobin), on poistettu 30 yleisimmän PExA-proteiinin joukosta.

Näytteissä A ja B havaitut yhteiset 77 proteiinia jaettiin eri luokkiin niiden toiminnan tai alkuperän mukaan. Eri toiminnan ja alkuperän mukaisia luokkia olivat: tulehdusproteiinit, immunoglobuliinit, entsyymit, kuljetusproteiinit, solunsisäinen aineenvaihdunta, soluliikenne, hyytymisjärjestelmä, keratiinit, tukirankaproteiinit ja rauhaseritys. Proteiineista 12:ta ilmeni merkittävän runsaasti terveillä kontrolleilla ja viittä proteiinia astmaa sairastavilla. Niiden jakautuminen eri proteiiniiryhmiin on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Proteiinien luokat sekä eroavaisuudet yleisyydessä.

Proteiiniluokka	Proteiini	Terve			Astmaatikko		
		A	B	A+B	A	B	A+B
Tulehdus	Surfactant protein A		<0.0010				
	Complement C3			0.033			
	Complement C4-A				0.0070		0.0070
Immunoglobuliinit	Immunoglobulin heavy constant alpha 1		0.0020				
	Polymeric immunoglobulin reseptor		<0.0010				
	Immunoglobulin heavy constant gamma 3						
	Immunoglobulin J chain		0.023				
Entsyymit	Alpha 1-antitrypsin		<0.0010				
	Trypsin-1				0.018		0.011
Kuljetus	Serum albumin		<0.0010				
	Hemopexin	0.0010	0.0010	<0.0010			
	Alpha-2-HS-glykoprotein	0.0040		0.0020			
Hyytymisjärjestelmä	Fibrinogen gamma chain			0.023			
Solunsisäinen aineenvaihdunta	DENN-domain containing protein 5B				0.029		0.028
	Elongation factor 2	<0.0010		<0.0010			
	78kDa glucose regulated-protein		0.023				
Keratiinit ja epidermaaliset proteiinit	Keratin, type I, cytoskeletal 17				0.011		
Soluliikenne							
Rauhaseritys							

Taulukossa 3 on esitetty eri PExA-proteiinien luokkia sekä eroavaisuuksia yleisyydessä sekä terveillä että astmaa sairastavilla lapsilla. Vain proteiinit, joilla on merkittävät p-arvot, on esitettyinä. Näyte A on otettu lähtötilanteessa ja näyte B keuhkoputkien laajennuksen jälkeen.

Päätelmät

Tämä tutkimus on ensimmäinen, joka luonnehtii uloshengitysilman partikkeleiden (PExA) proteiineja lapsilla. Massaspektrometrialla analysoituna PExA-proteiineja tunnistettiin 1303 eri proteiinia 18:ta terveellä ja 31:llä astmaa sairastavalla lapsella. Keuhkoputkia laajentavan lääkityksen annon jälkeen erilaisten proteiinien määrä lähes kuusinkertaistui terveillä. Runsaimmin ilmeneviä proteiineja olivat albumiini, SP-A ja DENN, kun taas puolestaan keratiinien ja sytoskeetaalisten proteiinien erottaminen kontaminaatiosta ja tulkitseminen näytteen osiksi oli haastavaa. Kullekin koehenkilölle määritettiin 50 runsaimmin esiintyvää proteiinia, ja näitä runsaimmin esiintyviä proteiineja oli yhteensä 225 erilaista. Näistä 12 proteiinia oli merkittävästi runsaammin terveillä koehenkilöillä ja viittä proteiinia puolestaan astmaa sairastavilla lapsilla. Nämä proteiinit kuuluvat toiminnallisesti erilaisiin proteiiniiryhmiin, kuten tulehdus- ja kuljetusproteiineihin, immunoglobuliineihin, entsyymeihin, solunsisäiseen aineenvaihduntaan ja keratiineihin.

PExA-proteiinien määrä

Tässä tutkimuksessa lapsilta kerätyn PExA- massan määrä oli selvästi pienempi (1-121 ng) verrattuna aikuisilla tehtyihin tutkimuksiin, joissa on ollut tavoitteena kerätä 120 ng/näyte. LCMS mahdollisti kuitenkin jopa 1303 eri proteiinin havaitsemisen 49 koehenkilöltä. Aiemmassa LCMS-tutkimuksessa, jossa tutkimuspopulaationa oli 12 tervettä aikuista, paljastui vain 124 proteiinia. Lisäksi kyseisessä tutkimuksessa havaittiin

korkeintaan 80 % samankaltaisuus bronkoalveolaarihuuhtelunesteeseen (BAL), joka kerättiin pääosin pienistä hengitysteistä (5). Östling ym. tutkivat PExA- proteiineja SOMAscan-proteomiikkalaitteistolla ja havaitsivat 1291 eri proteiinia 20: ltä terveeltä ja 10: ltä astmaa sairastavalta (8). Näytteistä, jotka sisälsivät 120-240 ng PExA -massaa, havaittiin 207 erilaista proteiinia 80%: ssa näytteistä, ja proteiinikoostumus muistutti BAL- nestettä (17). Östling ym. ehdottivat, että PExA sisältää pääasiassa eritettyjä ja solunulkoisia proteiineja. Vaikuttaa siltä, että PExA- massan määrä on lapsilla pienempi, mutta erilaisten PExA- proteiinien määrä on suurempi kuin aikuisilla. Havainto vaikuttaisi pätevän erityisesti terveillä keuhkoputkia avaavan lääkityksen annon jälkeen. Tämä saattaa kuvastaa paikallisen immuunipuolustuksen normaalia kehitystä tai pienten hengitysteiden luonnollista kasvua lapsilla. Eettisistä syistä BAL-huuhtelua ei suoritettu tässä tutkimuksessa, mutta PExA- tekniikka opetettiin huolellisesti ja suoritettiin asianmukaisesti. Ei ole myöskään syytä olettaa, etteikö PExA-näyte lapsilla olisi peräisin pienistä hengitysteistä.

Yksittäiset proteiinit

Yksittäisten alveoleista peräisin olevien proteiinien, kuten SP-A:n tunnistaminen tukee ajatusta siitä, että PExA muodostuu ilmatiehyissä. PExA-proteiinit voidaan luokitella eri ryhmiin niiden toiminnan ja muiden ominaisuuksien perusteella.

Albumiini on tärkeä kuljetusproteiini ja sillä on merkittävä rooli osmoottisen paineen aikaansaajana. Albumiini on runsautensa vuoksi ollut PExA:n tutkituin proteiini ELISA:lla. Keuhkojen epiteliaalisen sekä endoteliaalisen suojan läpäisevyydestä johtuen oletimme, että seerumin albumiini olisi runsain proteiini. Tämä oletamus vahvistui sekä terveillä että astmaa sairastavilla lapsilla (5), heijastaen plasman proteiinien vuotamista hengitysteihin (18).

Tässä tutkimuksessa SP-A oli toiseksi runsain proteiini sekä terveillä että astmaa sairastavilla lapsilla, ja sitä oli merkittävästi runsaammin terveillä koehenkilöillä keuhkoputkia avaavan lääkityksen annon jälkeen. SP-A:ta tuottavat alveolaariset tyypin II solut (19) ollen myös tärkeä elimistön puolustukselle ja surfaktantin toiminnalle (20). SP-A:ta pidetään potentiaalisena biomarkkerina hengityselinsairauksille, kuten astmalle, keuhkohtaumataudille ja keuhkofibroosille (21). SP-A:n havaittiin olevan myös toiseksi runsain PExA-proteiini terveillä aikuisilla (5). Koca ym. havaitsivat korrelaation puuttuvan SP-A:n osalta PExA:n ja plasman välillä, mikä viittaa siihen, että plasman SP-A ei kulkeudu vapaasti keuhkoepiteelin läpi ja toisaalta epiteelin vauriot voisivat näin ollen aiheuttaa SP-A:n kulkeutumisen verenkiertoon (22). Valitettavasti SOMAscan-proteomiikan alustalla ei ollut seerumin albumiinia tai SP-A:ta, joten niiden määristä ei ole tietoa (8). Sekä SP-A että albumiini korreloivat PExA-massaan terveillä koehenkilöillä (21). Alveolaariset tyypin II solut tuottavat useita komplementtitekijöitä (23). Bredberg ym. havaitsivat komplementtitekijöiden olevan yhdeksänneksi suurin ryhmä terveillä koehenkilöillä (5). Tässä tutkimuksessa komplementtitekijää C3 oli runsaammin terveillä koehenkilöillä kuin astmaa sairastavilla lapsilla. Komplementtitekijä C3 toimii keskeisenä tulehdusproteiinina komplementtijärjestelmässä. Näin ollen onkin mahdollista, että astmaa sairastavilla koehenkilöillä komplementtitekijä C3: ta ilmenee vähemmän suuremmasta kulutuksesta johtuen. Samalla tavalla tupakoinnin on havaittu liittyvän alhaisempiin komplementtitekijöiden 3 ja 5 pitoisuuksiin PExA:ssa (9). Onkin esitetty, että tupakointi aiheuttaisi ylimitoitettua komplementin aktivaatiota, mikä johtaisi näiden komplementtitekijöiden kulutukseen ja pitoisuuksien laskuun. Toisaalta tässä

tutkimuksessa havaittiin, että infektiioihin yhdistettyä komplementtitekijä C4: ää, esiintyi merkittävästi runsaammin astmaa sairastavilla lapsilla verrattuna terveisiin koehenkilöihin. Östling ym. havaitsivat kaiken kaikkiaan 19 eri komplementtitekijää SOMAscan-tutkimuksella (8).

Tässä tutkimuksessa neljänneksi runsain proteiiniiryhmä oli immunoglobuliinit (Ig), kuten IgA, IgG2, Ig lambda ketju 2 sekä polymeerinen immunoglobuliinireseptori. IgA, immunoglobuliinireseptori, IgG3 sekä J-ketju havaittiin olevan merkittävästi runsaampia terveillä koehenkilöillä. Samoin immunoglobuliinien havaittiin olevan PExA-proteiinien kolmanneksi runsain ryhmä terveillä koehenkilöillä (5).

Tässä tutkimuksessa havaittiin monia entsyymejä ja niiden säätelijöitä, kuten myös aiemmin aikuisia koskevissa tutkimuksissa on kuvattu (5). Alfa-1-antitrypsiiniä havaittiin merkittävästi enemmän terveillä koehenkilöillä keuhkoputkia avaavan lääkityksen annon jälkeen toisin kuin aiemmassa tutkimuksessa, jossa alfa-1-antitrypsiini oli koholla vain niillä astmaa sairastavilla potilailla, joilla on vähäinen hengitysteiden osallisuus (8). Alfa-1-antitrypsiini estää proteolyttistä elastaasientsyymiä, ja tämän proteaasi-estäjän puute on liitetty emfyseemaan.

Tässä tutkimuksessa esiintyi runsaasti solunsisäiseen aineenvaihduntaan osallistuvia proteiineja, kuten DENN (Differentially Expressed in Normal cells and Neoplasia) -domeenin proteiinia ja Elon 2: ta. Kolmanneksi runsainta proteiinia DENN:a oli merkittävästi runsaammin astmaa sairastavilla lapsilla lähtötilanteessa. DENN koordinoi solun sisällä solukalvon läpi tapahtuvaa kuljetusta. Toisaalta proteiinisynteesille tärkeää Elon 2 -proteiinia havaittiin vain kahdeksalla terveellä koehenkilöllä lähtötilanteessa. Kumpakaan näistä proteiineista ei ole mainittu aiemmissa PExA -proteomiikan tutkimuksissa.

Keratiinit ovat tärkeitä epiteelisolujen vakauden ja kasvun kannalta. Keratiinit muun muassa suojaavat soluja ja kudoksia stressiltä, säätelevät signaalien vaikutuksia sekä toimivat biomarkkereina tiettyjen elinten sairauksille. Sikiöllä keuhkojen kehityksen aikana keratiinien ilmenemistä kuvaa sytokeratiinit 7, 8 ja 18, kun taas toisen kolmanneksen aikana näiden määrä vähenee (24). Tässä tutkimuksessa keratiineja esiintyi runsaasti ja niiden epäiltiin olevan kontaminaatiota suun limakalvolta, ruokatorvesta, iholta, hiuksista tai kynsistä. Solun tukirankaperäisen tyypin I keratiini 17:a havaittiin ilmenevän merkittävästi runsaammin astmaa sairastavilla kuin terveillä koehenkilöillä. Edellä mainitun proteiinin on liitetty olevan yhteydessä onkogeneeseen signalointireittiin. PExA-tutkimuksissa keratiineja ei ole aiemmin käsitelty. Tässä tutkimuksessa solun tukirankaperäisen tyypin I keratiini 10: n, plakoglobiinin, fermciinin ja suprabasiinin ajateltiin olevan kontaminaatiota. Bredberg ym. pitivät filagriini 2: ta, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasia, malignien aivokasvainten 1 proteiinin poistuma-aineita, desmoplakiinin DPI-isoformia, prolaktiinista riippuvaista proteiinia ja serpiini B1: stä kontaminaationa (5).

Tutkimuksen rajoitukset

Olemme tietoisia siitä, että otoskoko olisi voinut olla suurempi. Keräämme vertailuaineistoa sekä terveiltä että astmaa sairastavilta lapsilta. Proteiinien tunnistus täytti luotettavan tunnistamisen kriteerit eri hakukoneissa, ja tarkemmin määritetyt proteiinit olivat selvästi tunnistuskynnyksen yläpuolella. Näytteiden heterogeenisyys havaittiin kuitenkin tässä

yhteydessä haasteeksi. Joidenkin näytteiden proteiiniprofiili eroaa radikaalisti keskimääräisen näytteen proteiiniprofiilia. Vielä ei ole selvää, johtuuko tämä poikkeuksellisesta fysiologisesta tai patologisesta tilanteesta yksilötasolla vai johtuuko heterogeenisyys artefaktasta PExA-näytteiden keräämisessä, kuten syljen tai muun eritteen päätyemisestä näytteeseen. Näytteiden heterogeenisyys sekä PExA-massan suuri vaihtelu vaikeuttaa kvantifiointia sekä arvojen normalisointia.

Johtopäätös

Tämä on ensimmäinen tutkimus, joka luonnehtii PExA-proteiineja lapsilla. Kerätty PExA-massa oli pienempi kuin aikuisilla. Tutkimuksessa käytetyt tekniikat mahdollistivat kuitenkin yli 1300 erilaisen proteiinin havaitsemisen 49 koehenkilöstä. Mielenkiintoista on, että terveillä lapsilla todettiin vapautuvan enemmän PExA-proteiineja keuhkoputkia avaavan lääkityksen annon jälkeen. Lapsilla havaittiin olevan pääosin runsaimmin esiintyvänä proteiineina albumiini, SP-A, komplementtitekijät, immunoglobuliinit sekä alfa 1-antitrypsiini, aivan kuten myös aikuisilla. Joitakin eroja havaittiin terveiden ja astmaa sairastavien lasten välillä.


Lähteet

1. Almstrand AC, Ljungström E, Lausmaa J ym. Airway monitoring by collection and mass spectrometric analysis of exhaled particles. *Analytical Chemistry* 2009; 81:662-8.
2. Larsson P, Lärstad M, Bake B ym. Exhaled particles as markers of small airway inflammation in subjects with asthma. *Clinical physiology and functional imaging* 2015; 37:489–497.
3. Carpaij OA, Muise S, Bell AJ ym. Assessing small airways dysfunction in asthma, asthma remission and healthy controls using particles in exhaled air. *ERJ Open Research* 2019; 5:00202-2019.
4. Bake B, Larsson P, Ljungkvist G ym. Exhaled particles and small airways. *Respiratory Research* 2019; 20:8.
5. Bredberg A, Goborn J, Almstrand A-C ym. Exhaled endogeneous particles contain lung proteins. *Clinical Chemistry* 2012; 58:431–40.
6. Soares M, Mirgorodskaya E, Koca H ym. Particles in exhaled air (PExA): non-invasive phenotyping of small airways disease in adult asthma. *Journal of Breath Research* 2018; 12:046012.
7. Hussain-Alkhatieb L, Bake B, Holm M ym. Novel non-invasive particles in exhaled air method to explore the lining fluid of small airways-a European population-based cohort study. *BMJ Open Respiratory Research* 2021; 8:e000804.
8. Östling J, van Geest M, Olsson HK ym. A novel non-invasive method allowing for discovery of pathologically relevant proteins from small airways. *Clinical Proteomics* 2022; 19:20-31.
9. Kokelj S, Östling J, Georgi B ym. Smoking induces sex-specific changes in the small airway proteome. *Respiratory Research*. 2021; 22:234.
10. Juusela M, Aaltonen V, Sarna S ym. Particles in exhaled air in assessment of asthma in children. Abstract ERJ 2018, Submitted 2023.
11. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V ym. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319-338.
12. Beydon N, Davis S, Lombardi E ym. American Thoracic Society/European Respiratory Society Working Group on Infant and Young Children Pulmonary Function Testing. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1304–1345.
13. Koillinen H, Wanne O, Niemi V ym. Reference values for flow-volume spirometry and peak expiratory flow rates in healthy Finnish children. *Finn Med J* 1998; 395-402.
14. Quanjer P, Brazzale D, Boros P ym. Implication of adopting the Global Lungs Initiative 2012 all-age reference equations for spirometry. *Eur Respir J* 2013; 42: 1046-1054.
15. Malmberg P, Pelkonen A, Poussa T ym. Determinants of respiratory system input impedance and bronchodilator response in healthy Finnish preschool children. *Clin Physiol Funct Imaging* 2002; 22: 64-71.
16. Dencker M, Malmberg P, Valind S ym. Reference values for respiratory system impedance by using impulse oscillometry in children aged 2–11 years. *Clin Physiol Funct Imaging* 2006; 26: 247-250.

17. Behndig AF, Mirgorodskaya E, Blomberg A ym. Surfactant Protein A in particles in exhaled air (PExA), bronchial lavage and bronchial wash - a methodological comparison. *Respiratory Research*. 2019; 20:214.
18. Khor YH, Teoh AKY, Lam SM ym. Increased vascular permeability precedes cellular inflammation as asthma control deteriorates. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1659-67.
19. Madsen J, Tornøe I, Nielsen O ym. Expression and localization of lung surfactant protein A in human tissues. *Am J Respir Cell Molecular Biology* 2003; 29:591-7.
20. Haczku A. Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:861-79.
21. Larsson P, Mirgorodskaya E, Samuelsson L ym. Surfactant protein A and albumin in particles in exhaled air. *Respiratory Medicine* 2012; 106:197-204.
22. Koca H, Farbroth A, Olin AC ym. Surfactant protein A in particles in exhaled air and plasma. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2022; 301:103899.
23. Strunk RC, Eidlen DM, Mason RJ. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J Clin Invest* 1988; 81:1419-26.
24. Turun yliopisto ja tekoälylinjaus. 2024. Turun yliopisto. Viitattu 11.9.2024. <https://utuguides.fi/tekoaly>

Liitteet

Liite 1. ERS posteri 2020



Proteins in exhaled air in assessment of asthma in children

Juusela M¹, Lehtinen M¹, Aaltonen V¹, Bergmann U², Sarna S³, Qvist E¹, Malmström K¹, Pikkujärvi Medical Centre for Children and Youth, Helsinki, Finland 2 Protein Analysis Core Facility, BioCenterOulu, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Oulu University, Oulu, Finland 3 Department of Public Health, Helsinki University, Finland.


INTRODUCTION

Non-invasive methods that provide real-time quantitative nano molecular biomarker data for clinical decision making are scarce.


Particles of exhaled air (PEXA) -method has been introduced in research over the past decades¹. By collecting impacted non-volatile particles that originate from the respiratory lining fluid (RLF) new data has created a deeper understanding of conditions and spectrum of different biomarkers in the small airways.

We are the first to study PEXA method and its feasibility in children. We have concluded: 1) asthmatic children present significantly lower level of exhaled particles than healthy controls. 2) the repeatability of PEXA measurements in children is good. Short term, day to day, variability is excellent, in which the intra class co-efficient (ICC) for single measures is 0.938 and for average measures 0.948; 3) the first exhalations at baseline with PEXA 2.0 seems to discriminate healthy children from the asthmatics.

A_ asthma child



C_ healthy child



Picture A and C demonstrate real-time PEXA screen views.

In the present study, we investigate protein distribution collected with PEXA 2.0. *

SUBJECTS & METHODS

Subjects:

50 randomly selected subjects (6-18 years) were included, a third were healthy controls (C). Asthma group (A) included subjects with doctor diagnosed asthma and subjects taking diagnostic lung function (LF) tests. All studied participate in Pikkujärvi Asthma Study since 2017.


Methods:

Lung function (LF) was measured with spirometry or impulse oscillometry, with or without a free run test. PEXA was assessed at baseline (a) and after bronchodilation test (b).

Exhaled particles, expired air volume and air flow were documented. Impacted particles were collected on two separate Teflon-filters (a,b).

Proteins were alkylated, digested and separated by liquid-chromatography, detected by mass spectrometry, followed by search against Swiss-Prot human database to identify proteins with at least two peptides and FDR >0.01.

Doctor diagnosed asthma, asthma medication, allergy, respiratory infections, present symptoms (nose, throat, lungs) and exposure to tobacco smoke were asked.



RESULTS

Results:

Detection of different protein amounts in PEXA was successfully assessed in children.

Protein amounts in Group C and Group A did not significantly differ at baseline: 5.28 (CI95% 2.1-8.39) and 5.70 (CI95% 4.17-7.22) x10¹⁰, respectively.

After bronchodilation Group C demonstrated more, different kinds of proteins than Group A, 274 vs. 229, p=0.038. (Fig.1.)

Protein amounts did not correlate with particles counts, age, height, BMI, medication, symptoms, LF or exposure to tobacco smoke.

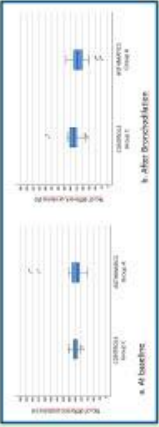


Figure 1. Proteins increased in healthy controls only, p=0.038.

Conclusions: Healthy and asthmatic children presented no difference in protein amounts in exhaled air. However, after bronchodilation healthy controls presented a larger variety in number of detected proteins.

REFERENCES: 1 Bate et al. Exhaled particles and small airways. Respiratory Research (2019) 20:18. 2 PD3274-ERS2018 & PD18947-ERS2019.

* Impacted particles (PEX) collected on filters provide huge potential for biomarker studies.



Particles in exhaled air (PExA) - the protein composition in children

K. Malmström¹, Lehtinen M¹, Bergmann U², Meri S³, Sarma S³, Aaltonen V¹, Qvist E¹, Juusela M¹

¹Paikallinen Neuvola Centre for Children and Youth - Helsinki (Finland), ²Oulu University - Oulu (Finland), ³Helsinki University - Helsinki (Finland)



INTRODUCTION

Particles in exhaled air (PExA) technique provides sampling of particles from the respiratory tract lining fluid from small airways after airway closure and reopening during exhalation. The overall yield of PExA in children is lower than that in adults and the number of PExA is significantly less in asthmatic than that in healthy children (1).

In earlier studies in healthy adults 120 different proteins eg. albumin, surfactant protein A (SP-A), immunoglobulins, serotransferrins, Clara cell proteins, enzymes, annexins and complement factors have been detected by mass spectrometry (2).

Aim: In the present study, we determine the major proteins in PExA by mass spectrometry in healthy and asthmatic children.

SUBJECTS & METHODS

Subjects: There were 49 randomly selected subjects (6-18 years) for whom PExA was done as an additional test during lung function measurements. There were 18 (37%) healthy children (mean age 12.5 yrs) with a normal lung function assessed by spirometry or impulse oscillometry and no use of any asthma medication, and 31 subjects (63%) with physician-diagnosed asthma (mean age 10.5 yrs).

Methods: PExA were collected before (sample A) and after bronchodilation (sample B). A specific breathing technique was used for collecting the particles by PExA 1.0 (PExA, Sweden).

The proteins were analyzed by liquid chromatography mass spectrometry. The abundances of accepted proteins were divided by individual flow volumes to make values comparative and logarithmic scaling was performed.

RESULTS

The mean PExA mass and the mean volume of expired air were significantly higher in controls than in asthmatics both before (sample A) and after bronchodilation (sample B), Table 1. Also, the number of different proteins was bigger in controls after bronchodilation.

Mean PExA mass	Sample A	Controls	Asthmatics	P
Mean PExA mass (µg)	0.11 (0.01)	0.11 (0.01)	0.07 (0.01)	0.001
Mean PExA volume (ml)	0.14 (0.01)	0.14 (0.01)	0.09 (0.01)	0.001
Number of different proteins	100 (10)	100 (10)	80 (8)	0.001
Protein mass by mass spectrometry (µg)	0.11 (0.01)	0.11 (0.01)	0.07 (0.01)	0.001

Although the PExA mass was clearly smaller in children than that described in adults, we were able to detect overall 437 proteins from samples A, and 1176 proteins after bronchodilation (sample B), Figure.



From the fifty most abundant proteins per subject, 130 different proteins were found in sample A and 154 in sample B. In all 225 different proteins were detected of which 77 were common in A and B samples, and the 30 most abundant proteins are shown in Table 2.

Protein	Sample A	Sample B
Albumin	100	100
Surfactant protein A	100	100
Immunoglobulin G	100	100
Transferrin	100	100
Annexin A1	100	100
Annexin A2	100	100
Annexin A3	100	100
Annexin A5	100	100
Annexin A6	100	100
Annexin A7	100	100
Annexin A8	100	100
Annexin A9	100	100
Annexin A10	100	100
Annexin A11	100	100
Annexin A12	100	100
Annexin A13	100	100
Annexin A14	100	100
Annexin A15	100	100
Annexin A16	100	100
Annexin A17	100	100
Annexin A18	100	100
Annexin A19	100	100
Annexin A20	100	100
Annexin A21	100	100
Annexin A22	100	100
Annexin A23	100	100
Annexin A24	100	100
Annexin A25	100	100
Annexin A26	100	100
Annexin A27	100	100
Annexin A28	100	100
Annexin A29	100	100
Annexin A30	100	100

RESULTS

The 77 proteins detected in both A and B samples were grouped into different classes according to their function or origin. Except for contaminant proteins, twelve proteins were significantly abundant in healthy and four proteins in asthmatics, Table 3. Albumin and trypsin were detected in all controls and asthmatics whereas surfactant protein A was detected in all controls and in 29/31 (94%) asthmatics.

Protein	A	B	P
Albumin	100	100	0.001
Surfactant protein A	100	100	0.001
Immunoglobulin G	100	100	0.001
Transferrin	100	100	0.001
Annexin A1	100	100	0.001
Annexin A2	100	100	0.001
Annexin A3	100	100	0.001
Annexin A5	100	100	0.001
Annexin A6	100	100	0.001
Annexin A7	100	100	0.001
Annexin A8	100	100	0.001
Annexin A9	100	100	0.001
Annexin A10	100	100	0.001
Annexin A11	100	100	0.001
Annexin A12	100	100	0.001
Annexin A13	100	100	0.001
Annexin A14	100	100	0.001
Annexin A15	100	100	0.001
Annexin A16	100	100	0.001
Annexin A17	100	100	0.001
Annexin A18	100	100	0.001
Annexin A19	100	100	0.001
Annexin A20	100	100	0.001
Annexin A21	100	100	0.001
Annexin A22	100	100	0.001
Annexin A23	100	100	0.001
Annexin A24	100	100	0.001
Annexin A25	100	100	0.001
Annexin A26	100	100	0.001
Annexin A27	100	100	0.001
Annexin A28	100	100	0.001
Annexin A29	100	100	0.001
Annexin A30	100	100	0.001

CONCLUSIONS

This is the first study characterizing PExA proteins in children. The used techniques enabled detection of over 1300 different proteins from 49 individuals. Interestingly, more PExA proteins were released after bronchodilation in healthy children.

The main PExA proteins were albumin, surfactant protein A, complement factors, immunoglobulins and alpha 1-antitrypsin, similarly than in adults (2). Some differences were found between healthy and asthmatics.

References: 1. Juusela M, et al. Particles in exhaled air in assessment of asthma in children. Poster discussion ERS 2018; submitted 2023. 2. Broberg A, et al. Exhaled endogenous particles contain lung proteins. *Clinical Chemistry* 2012; 58:431-40.

*Albumin and surfactant protein A were the most abundant PExA proteins in children followed by complement factors, immunoglobulins, proteases, and metabolic proteins.
 **There were differences in PExA proteins between healthy and asthmatic children.

Liite 3. NCL posteri 2024

Protein composition in exhaled air in assessment of asthma in children- a PEXA study

Juusela M¹, Vuori M¹, Bergmann U², Aaltonen V¹, Katajavuori K¹, Laakko E¹, Hautamäki A¹, Myllylä M¹, Sarna S³, Meri S⁴, Qvist E¹, Malmström K¹



¹Pikkujättilä Medical Centre for Children and Youth - Helsinki (Finland), ²Protein Analysis Core Facility, Biocenter Oulu, Department of Biochemistry and Molecular Medicine Oulu University - Oulu (Finland), ³Department of Public Health, Helsinki University, Helsinki (Finland), ⁴Helsinki University, Helsinki, (Finland). Contact: maria.juusela@pikkujattil.fi

INTRODUCTION

Particles of exhaled air (PEXA[®]) – method is used in research at several centers in the Nordic countries and Central Europe.

By collecting impacted particles that originate from the respiratory lining fluid we gain information of different biomarkers, protein and phospholipids from distal airways.

The overall yield of PEXA in children is lower than that in adults and the number of PEXA is significantly less in asthmatic than that in healthy children¹.

In earlier studies in healthy adults 120 different proteins eg. albumin, surfactant protein A (SP-A), immunoglobulins, serotransferrins, Clara cell proteins, enzymes, annexins and complement factors have been detected by mass spectrometry².

Aims of the study: to determine the major proteins in PEXA by mass spectrometry and to study the differences in protein compositions between the healthy and asthmatic children.

SUBJECTS

49 randomly selected subjects (6-18 years) were included: (A) asthma group (n=31) and (C) healthy controls (n=18).

*Albumin and surfactant protein A were the most abundant PEXA proteins in children followed by complement factors, immunoglobulins, proteases, and metabolic proteins.

METHODS

Lung function was measured. PEXA was assessed as an additional test at baseline (A) and after bronchodilation test (B). A specific breathing technique was used for collecting the particles by PEXA 1.0 (PEXA[®], Sweden). Impacted particles were collected on two separate filters. Proteins were alkylated, digested and separated by liquid chromatography, detected by mass spectrometry followed by search against Swiss-Prot human database to identify proteins with at least two peptides and FDR >0.01. The abundances of accepted proteins were divided by individual flow volumes to make values comparative. Cluster analysis was conducted, and the protein distribution illustrated on a heatmap.

Table 1. PEXA values

Sample	Controls	Asthmatics	p ¹
Mass, ng, mean (sd)	A	10.1 (10.2)	0.0019
	B	20.4 (20.4)	0.0016
Exhaled air volume, L, mean (sd)	A	31.8 (19.7)	0.003
	B	45.2 (17.5)	0.01
Number of different proteins (sd)	A	200 (20)	0.002
	B	201 (20)	0.014

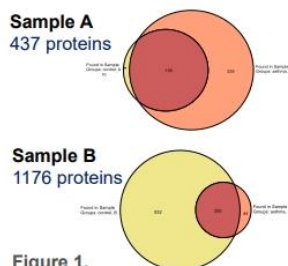


Figure 1.

From the fifty most abundant proteins per subject, 130 different proteins were found in sample A and 164 in sample B. The 30 most abundant proteins are shown in Table 2.*

RESULTS

The mean PEX mass was significantly bigger in controls than in asthmatics (30 ng vs 10 ng).

Overall 437 proteins were detected from samples A, and 1176 proteins after bronchodilation. (Figure 1.)

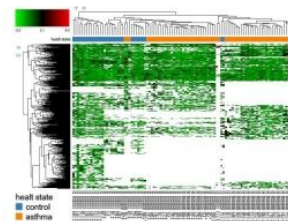


Figure 2.

After bronchodilation healthy controls presented a larger variety in number of detected proteins compared to the asthma group.

From the fifty most abundant proteins per subject, in all 225 different proteins were detected of which 77 were common in A and B samples. Albumin and trypsin were detected in all controls and asthmatics whereas surfactant protein A was detected in all controls and in 29/31 (94%) asthmatics.

On the heatmap certain protein groups were absent in the asthma samples. (Figure 2.)

Table 2. The 30 most abundant proteins in numerical order. These not in bold are considered as contaminants from cells, mucus membranes and degraded cells.

Caldesmon 1, type 1	Diuretic 1	Alfa 1-antitrypsin
Hexokinase 1, cytosolic 2	Chaperone	Complement C3
Hexokinase 1, cytosolic 2	Hexokinase, type 1, cytosolic 17	Immunoglobulin 4
Albumin	Trypsinogen	Surfactant
Hexokinase 1, cytosolic 1	Lactoferrin	Surfactant factor 2
Hexokinase 1, cytosolic 18	Chaperonin 60	Surfactant protein A2
Surfactant protein A2	Complement C3	Immunoglobulin 3
IGFBP domain-containing protein 18	Thyroglobulin	Proteinase 3 receptor
Hexokinase 1, cytosolic 14	Caldesmon-like protein 1	Cluster
Hexokinase 1, cytosolic 15	Immunoglobulin 2	Gene

*Except for contaminant proteins, twelve proteins were significantly abundant in healthy and four proteins in asthmatics.

CONCLUSIONS

This is the first study characterizing PEXA proteins in children. The main PEXA proteins were albumin, surfactant protein A, complement factors, immunoglobulins and alfa 1-antitrypsin. Protein composition differs between the healthy and the asthmatics as presented on a heatmap. Many proteins are not found with asthma samples. These differences need further attention.

References: 1. Juusela M, et al. Particles in exhaled air in assessment of asthma in children. Poster discussion ERS 2018, submitted 2024. 2. Lindberg A, et al. Exhaled progenitor particles contain lung proteins. Clinical Chemistry 2012; 58:431-40.

Liite 4.

TIEDOTE PIKKUJÄTIN LÄÄKÄREILLE JA HENKILÖKUNNALLE

PExA-menettelmän kliininen käyttö lasten astmassa

PExA-menettelmä (*particles in exhaled air*) on non-invasiivinen menettelmä, jonka avulla saadaan uloshengitysilman partikkeleiden perusteella kerättyä tietoa hengitysteiden perifeerisimmistä osista ja siellä mahdollisesti ilmenevistä inflammatorisista muutoksista. PExA on kliinisessä tutkimuskäytössä seitsemässä eri keskuksessa Euroopassa, mm. Göteborgin ja Uppsalan yliopistoissa, Karoliinisessa sairaalassa, ja Groningenin yliopistosairaalassa. Göteborgissa yli 1000 aikuispotilasta on jo tutkittu PExA-menettelmällä.

PExA 2.0 laite on ollut tutkimuskäytössä Tapiolan Pikkujätissä kesäkuun 2017 lopulta lähtien. Olemme tehneet ensimmäisen tutkimuksen astman tai astmaepäilyn vuoksi keuhkofunktiokokeisiin tulleesta 40 potilaasta sekä 20 terveestä ikävakioidusta kontrollihenkilöstä, ikäjakauma 4-18 vuotta. Tulokset ovat lupaavia ja ensimmäiset tutkimustulokset esitettiin syyskuussa 2018 European Respiratory Society'n kongressissa, Uusimmat tulokset on hyväksytty esitettäväksi 2019 ERS kongressissa syyskuussa.

Uuden menettelmän kliinisen käyttöönoton kannalta on nyt tärkeä saada riittävästi PExA-tutkimuksia tehdyksi ja tietoa tämän uuden metodin kliinisestä käytettävyydestä lasten astmassa. Jatkamme PExA-näytteiden keräämistä Tapiolan PJ keuhkojen toimintakokeisiin tulevilta lapsilta. Tavoitteena on kerätä PExA näytteet 600 lapselta ja nuorelta samassa suhteessa kuin alkuperäisessä tutkimussuunnitelmassa eli 2/3 astmaatikoilta tai astmaoireisilta ja 1/3 terveiltä, aikataulullisesti 31.12.2022 mennessä. Hoitajat antavat potilaalle ja hänen vanhemmilleen erikseen tiedotteen ja suostumuslomakkeen tutkimukseen osallistumisesta. HUS lasten ja nuorten sairauksien eettinen toimikunta on antanut puoltavan lausunnon näytteiden keräämisen jatkamiseen. Tutkimus on luonnollisesti maksuton.

Uloshengitysilman partikkeleiden mittauksen kesto on arviolta 10-15 min. Muutaman (3) tavallisen hengityksen jälkeen tutkittava ohjataan pidättämään hengitystä noin 5 s ajan, jonka jälkeen tehdään sisään- ja uloshengitykset (kaavakuva alla). Perusvaiheen partikkelimittausten jälkeen henkilö tekee Pikkujätissä käytössä olevilla menettelmillä keuhkojen toimintakokeet, kuten spirometrian tai impulssioskillometrian. PExA-mittaukset tehdään perusvaiheessa ja keuhkoputkia avaavan lääkkeen ottamisen jälkeen. Lisäksi selvitetään potilaiden allergia- ja astmaoireita sekä kysytään vanhempien tupakoinnista. Tutkimuksien tekemisestä ja laitteista vastaa kliinisen fysiologian erikoislääkäri.

Tutkimuksen tekijöinä ovat erikoislääkärit LT Maria Juusela, dos LT Kristiina Malmström, dos LT Erik Qvist sekä LK Venla Aaltonen ja lääkäri Marjut Lehtinen.

Tiedustelut: maria.juusela@pikkujatti.fi; 040-7461526.

Espossa 5.6.2019 Tutkijalääkärit

Liite 5.

Turun yliopiston Lääketieteellisen tiedekunnan opinnäytetyöni kokonaisuudessaan sisälsi potilasaineiston demografian kuvaamista ja taulukointia, PExA-mittausten tekemistä lapsilla, PexA-näytteiden käsittelyä sekä massaspektrometriatulosten järjestämistä järkevään käsittelymuotoon. Tarkemmat massaspektrometriatulosten analysoinnit tehtiin yhteistyössä emeritus professori Seppo Sarnan kanssa, Helsingin yliopiston kansanterveystieteen laitokselta. Tuloksista julkaistaan artikkeli "Particles in exhaled air – protein analyses", jossa olen toisena kirjoittajana. Alkuperäistä artikkelia ei vielä ole julkaistu, joten tämä opinnäytetyön kirjallinen osuus on suomennos alkuperäisestä artikkelista siinä vaiheessa, kun se on syyskuussa 2024 ollut.

Lisäksi osallistuin liitteinä oleviin postereihin (huom. entinen Lehtinen, nykyisin Vuori) sekä olin tutkimusryhmämme mukana esittelemässä tutkimustamme ERS kongressissa vuonna 2019.