

Диагностика заболеваний легких на основе протеомного анализа конденсата выдыхаемого воздуха

Э.Х.Анаев¹, К.Ю.Федорченко^{2,3}, М.Э.Кушаева¹, А.М.Рябоконе^{2,3}, А.С.Кононихин³, В.В.Бармин³, О.В.Пикин⁴, И.А.Попов³, Е.Н.Николаев³, С.Д.Варфоломеев^{2,3}, А.Г.Чучалин¹

- 1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства России»: 105077, Россия, Москва, ул. 11-я Парковая, 32, корп. 4;
- 2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»: 119991, Москва, Ленинские горы, 1;
- 3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук: 119991, Москва, ул. Косыгина, 4;
- 4 – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена» Министерства здравоохранения Российской Федерации: 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., 3

Информация об авторах

Анаев Эльдар Хусеевич – д. м. н., заведующий лабораторией неинвазивных методов диагностики клинического отдела Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства России»; тел.: (495) 465-53-84; e-mail: el_anaev@hotmail.com

Федорченко Кристина Юрьевна – ассистент Международного учебно-научного биотехнологического центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», научный сотрудник лаборатории кинетики и механизмов ферментативных и каталитических реакций Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук; тел.: (495) 939-71-40; e-mail: fedorchenko_kris@mail.ru

Кушаева Миясат Эльдаровна – младший научный сотрудник лаборатории неинвазивных методов диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства России»; тел.: (495) 465-53-84; e-mail: dr_miya@mail.ru

Рябоконе Анна Монолитовна – к. х. н., научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», старший научный сотрудник лаборатории кинетики и механизмов ферментативных и каталитических реакций Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук; тел.: (495) 939-71-40; e-mail: amryabokon@gmail.com

Кононихин Алексей Сергеевич – к. ф.-м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук; тел.: (495) 939-73-70; e-mail: konoleha@yandex.ru

Бармин Виталий Валерьевич – младший научный сотрудник отделения торакальной хирургии Федерального государственного бюджетного учреждения «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (495) 945-41-20; e-mail: vitaly.barmin@gmail.com

Пикин Олег Валентинович – д. м. н., руководитель отделения торакальной хирургии Федерального государственного бюджетного учреждения «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (495) 945-41-20; e-mail: pikin_ov@mail.ru

Попов Игорь Алексеевич – к. ф.-м. н., старший научный сотрудник лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук; тел.: (495) 939-73-70; e-mail: hexapole@gmail.com

Николаев Евгений Николаевич – д. ф.-м. н., профессор, заведующий лабораторией масс-спектрометрии биомакромолекул Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук; тел.: (495) 939-73-70; e-mail: ennikolaev@rambler.ru

Варфоломеев Сергей Дмитриевич – д. м. н., профессор, член-корреспондент Российской академии наук, заведующий кафедрой химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», научный руководитель Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля» Российской академии наук; тел.: (499) 137-64-20; e-mail: sdvarf@sky.chph.ras.ru

Чучалин Александр Григорьевич – д. м. н., профессор, академик Российской академии наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства России», председатель правления Российского респираторного общества, главный внештатный специалист терапевт-пульмонолог Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: (495) 465-52-64; e-mail: pulmo_fmiba@mail.ru

Резюме

Исследование конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) является неинвазивным методом диагностики заболеваний органов дыхания. Протеомный анализ КВВ – перспективный метод диагностики, позволяющий понять патологические механизмы и выявить различные фенотипы легочных заболеваний. **Цель.** Сравнительное изучение белкового спектра КВВ у здоровых добровольцев и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), пневмонией и немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), а также оценка возможности использования протеомного анализа КВВ для диагностики и дифференциальной диагностики этих заболеваний. **Материалы и методы.** Обследованы лица с ХОБЛ ($n = 18$), внебольничной пневмонией ($n = 13$), НМРЛ ($n = 26$) и здоровые некурящие добровольцы ($n = 24$). КВВ собран стандартизованным методом с помощью аппарата *ECoScreen (Viasys Healthcare, Германия)*. Лиофилизированные и подвергнутые гидролизу трипсином образцы КВВ проанализированы с помощью нанопоточной высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. Для поиска и идентификации белков использованы предоставленные Европейским институтом биоинформатики базы данных *Mascot (Matrix Science, Великобритания)* и *IPI-human (version 3.82)*. **Результаты.** При протеомном анализе КВВ обследованных доноров 4 групп выявлено > 300 различных белков, большую часть которых составляют цитоскелетные кератины I и II типов. Отмечено значительно более высокое содержание некоторых кератинов (5, 6 и 14) в образцах КВВ больных НМРЛ по сравнению с таковым у здоровых добровольцев. В КВВ у здоровых добровольцев, а также у больных ХОБЛ и пневмонией идентифицированы дермидин, иммуноглобулин- α , кининоген, цитоплазматический актин, сывороточный альбумин, цинк- α_2 -гликопротеин. Высокое содержание пероксиредоксина в КВВ у больных ХОБЛ указывает на выраженный окислительный стресс. В образцах КВВ у пациентов с пневмонией обнаружен высокий уровень белков острой фазы воспаления и гипоксии (аннексины A1 и A2, HSP90B, цистатины M и B, фрагменты коллагенов и гистонов). В КВВ у больных НМРЛ определены β - и α -субъединицы гемоглобина, ядерный убиквитиновый казеин, РОТЕЕ, белки группы высокой мобильности (HMG-I / HMG-Y), лактоферрин. **Заключение.** В образцах КВВ у здоровых людей,

больных ХОБЛ, пневмонией и НМРЛ обнаружен характерный белковый спектр. Большинство выявленных белков могут быть предложены в качестве панели для диагностики указанных заболеваний.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, пневмония, рак легкого, диагностика, биомаркеры, конденсат выдыхаемого воздуха, протеомный анализ.

Для цитирования: Анаев Э.Х., Федорченко К.Ю., Кушаева М.Э., Рябоконт А.М., Кононихин А.С., Бармин В.В., Пикин О.В., Попов И.А., Николаев Е.Н., Варфоломеев С.Д., Чучалин А.Г. Диагностика заболеваний легких на основе протеомного анализа конденсата выдыхаемого воздуха. *Пульмонология*. 2017; 27 (2): 187–197. DOI: 10.18093/0869-0189-2017-27-2-187-197

Diagnosis of respiratory diseases using the proteomic analysis of exhaled breath condensate

El'dar Kh. Anaev¹, Kristina Yu. Fedorchenko^{2,3}, Miyasat E. Kushaeva¹, Anna M. Ryabokon'^{2,3}, Aleksey S. Kononikhin³, Vitaliy V. Barmin⁴, Oleg V. Pikin⁴, Igor' A. Popov³, Evgeniy N. Nikolaev³, Sergey D. Varfolomeev^{2,3}, Aleksandr G. Chuchalin¹

1 – Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia: Odinnadstaya Parkovaya ul. 32, build. 4, Moscow, 105077, Russia;

2 – M.V.Lomonosov Moscow Federal State University: Leninskie gory 1, Moscow, 119991, Russia;

3 – N.M.Emanuel' Federal State Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences: Kosygina ul. 4, Moscow, 119991, Russia;

4 – P.A.Gertsen Moscow Federal Research Oncology Institute, Healthcare Ministry of Russian Federation: Vtoroy Botkinskiy pr. 3, Moscow, 125284, Russia

Author information

El'dar Kh. Anaev, Doctor of Medicine, Head of Laboratory of Non-invasive Diagnostic Methods, Clinical Division, Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia; tel.: (495) 465-53-84; e-mail: el_anaev@hotmail.com

Kristina Yu. Fedorchenko, Assistant Lecturer, International Educational and Research Biotechnological Center, M.V.Lomonosov Moscow Federal State University; Researcher at Laboratory of Kinetics and Mechanisms of Enzymatic and Catalytic Reactions, N.M.Emanuel' Federal State Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; tel.: (495) 939-71-40; e-mail: fedorchenko_kris@mail.ru

Miyasat E. Kushaeva, Junior Researcher, Laboratory of Non-invasive Diagnostic Methods, Clinical Division, Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia; tel.: (495) 465-53-84; e-mail: dr_miya@mail.ru

Anna M. Ryabokon', Candidate of Chemistry, Researcher at Department of Chemical Enzymology, Chemical Faculty, M.V.Lomonosov Moscow Federal State University; Senior Researcher at Laboratory of Kinetics and Mechanisms of Enzymatic and Catalytic Reactions, N.M.Emanuel' Federal State Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; tel.: (495) 939-71-40; e-mail: amryabokon@gmail.com

Aleksey S. Kononikhin, Candidate of Physics & Mathematics, Leading Researcher, Laboratory of Mass-spectrometry of Biomacromolecules, N.M.Emanuel' Federal State Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; tel.: (495) 939-73-70; e-mail: konoleha@yandex.ru

Vitaliy V. Barmin, Junior Researcher, Department of Thoracic Surgery, P.A.Gertsen Moscow Federal Research Oncology Institute, Healthcare Ministry of Russian Federation, tel.: (495) 945-41-20; e-mail: vitaliy.barmin@gmail.com

Oleg V. Pikin, Doctor of Medicine, Head of Department of Thoracic Surgery, P.A.Gertsen Moscow Federal Research Oncology Institute, Healthcare Ministry of Russian Federation, tel.: (495) 945-41-20; e-mail: pikin_ov@mail.ru

Igor' A. Popov, Candidate of Physics & Mathematics, Senior Researcher, Laboratory of Mass-spectrometry of Biomacromolecules, N.M.Emanuel' Federal State Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; tel.: (495) 939-73-70; e-mail: hexapole@gmail.com

Evgeniy N. Nikolaev, Doctor of Physics & Mathematics, Professor, Head of Laboratory of Mass-spectrometry of Biomacromolecules, N.M.Emanuel' Federal State Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; tel.: (495) 939-73-70; e-mail: ennikolaev@rambler.ru

Sergey D. Varfolomeev, Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Head of Department of Chemical Enzymology, Chemical Faculty, M.V.Lomonosov Moscow Federal State University; Academic Advisor of N.M.Emanuel' Federal State Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; tel.: (499) 137-64-20; e-mail: sdvarf@sky.chph.ras.ru

Aleksandr G. Chuchalin, Doctor of Medicine, Professor, Academician of Russian Science Academy, Director of Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia; Chairman of the Executive Board of Russian Respiratory Society; Chief Therapist of Healthcare Ministry of Russia; tel.: (495) 465-52-64; e-mail: pulmo_fmba@mail.ru

Abstract

Investigation of exhaled breath condensate (EBC) is a noninvasive diagnostic method in respiratory diseases. The objective of this study was to compare EBC protein spectrum in healthy volunteers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), pneumonia and lung cancer (NSCLC), as well as to assess a role of proteomic analysis of EBC for diagnosis and differential diagnosis of these diseases. **Methods.** We examined 18 patients with COPD, 13 patients with community-acquired pneumonia, 26 patients with lung cancer and 24 healthy non-smoking volunteers. EBC was collected using ECoScreen system (VIASYS Healthcare, Germany) and a standardized method. EBC-samples were lyophilized, hydrolyzed and analyzed by HPLC and tandem mass spectrometry. To identify proteins, we used Mascot (Matrix Science, UK) and IPI-human (version 3.82) databases provided by the European Bioinformatics Institute. **Results.** Proteomic analysis of EBC identified more than 300 different proteins; most of them were types I and II cytoskeletal keratins. Cytokeratin 5, 6, and 14 concentrations in EBC of NSCLC patients were significantly higher than that in healthy volunteers. Dermcidin, immunoglobulin alpha, kininogen, cytoplasmic actin, serum albumin, and Zn-alpha2-glycoprotein were identified in EBC of healthy volunteers and patients with COPD and pneumonia. High concentration of peroxiredoxin in EBC of COPD patients could be due to severe oxidative stress. High levels of acute-phase and hypoxia proteins (annexins A1 and A2, HSP90B, cystatins M and B, collagen and histones fragments) were detected in EBC of pneumonia patients. Also, β - и α -subunit of hemoglobin, nuclear ubiquitin casein (NUCKS), POTE, high mobility group protein (HMG-I/HMG-Y) and lactoferrin were identified in EBC of NSCLC patients. **Conclusion.** We found that EBC in healthy nonsmokers and in patients with COPD, pneumonia and NSCLC had characteristic protein spectrum. Most of the identified proteins could be used for diagnosis of these diseases.

Key words: COPD; community-acquired pneumonia; lung cancer; diagnosis; biomarkers; exhaled breath condensate; proteomic analysis.

For citation: Anaev E.Kh., Fedorchenko K.Yu., Kushaeva M.E., Ryabokon' A.M., Kononikhin A.S., Barmin V.V., Pikin O.V., Popov I.A., Nikolaev E.N., Varfolomeev S.D., Chuchalin A.G. Diagnosis of respiratory diseases using the proteomic analysis of exhaled breath condensate. *Russian Pulmonology*. 2017; 27 (2): 187–197 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2017-27-2-187-197

Исследование конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) является перспективным неинвазивным методом оценки состояния дыхательной системы. Проводимые в настоящее время исследования направлены на поиск в КВВ летучих и нелетучих макромолекулярных соединений, таких как белки, нуклеотиды и липиды, которые содержатся в следовых количествах и являются биомаркерами болезней органов дыхания [1, 2]. Методики определения биомаркеров в КВВ постоянно совершенствуются, разрабатываются методы детекции и идентификации биологически активных соединений в ультраследовых концентрациях [3–5]. Для улучшения репродуктивности методов требуется концентрирование образцов и разработка более чувствительных и селективных технологий.

Использование инновационных омик-технологий, таких как метаболомика и протеомика, обладает огромным потенциалом в области профилирования биомаркеров выдыхаемого воздуха [6, 7]. Создание общедоступных баз данных генетических структур в сочетании с жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией обеспечивают возможность определения биомаркеров в различных жидкостях и тканях человека [8, 9]. Биомаркеры оцениваются для понимания патологических механизмов, выявления различных фенотипов заболевания, а также при оценке эффективности проводимой терапии [10, 11].

В последние годы внимание многих ученых привлекает протеомный анализ КВВ, используемый для диагностики различных заболеваний легких, в т. ч. раннего выявления немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [4, 12]. Основными цитоскелетными белками в КВВ являются кератины, некоторые из них уже используются в клинической практике для диагностики рака легкого (РЛ) – например тест-система CYFRA 21-1, применяемая при мониторинге и оценке эффективности лечения у лиц с плоскоклеточным РЛ. Одновременное определение 2 различных опухолевых маркеров – CYFRA 21-1 и карциноэмбрионального антигена, локализованного в мембранах эпителиальных клеток, значительно повышает точность диагностики РЛ. Показано, что кальций-связывающий белок S100A7 может быть использован в качестве потенциального маркера крупноклеточной карциномы легкого [11, 13].

Целью работы явилось сравнительное исследование белкового спектра КВВ у здоровых добровольцев, больных ХОБЛ, пневмонией и НМРЛ, а также оценка возможности использования протеомного анализа КВВ для диагностики и дифференциальной диагностики этих заболеваний.

Материалы и методы

Обследованы пациенты ($n = 81$), в т. ч. с ХОБЛ в стадии обострения ($n = 18$), внебольничной пневмонией ($n = 13$), верифицированным НМРЛ ($n = 26$) и здоровые некурящие добровольцы ($n = 24$). Больные ХОБЛ и пневмонией находились на стационарном лечении в пульмонологическом отделении Госу-

дарственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени Д.Д.Плетнева Департамента здравоохранения города Москвы», пациенты с РЛ – в торакальном отделении Федерального государственного бюджетного учреждения «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Диагностика ХОБЛ, пневмонии и РЛ осуществлялась на основании современных общепринятых рекомендаций [14–16].

Все пациенты и здоровые добровольцы подписали информированное согласие об участии в исследовании. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства России».

У больных ХОБЛ ($n = 18$: 14 мужчин и 4 женщины; средний возраст – $65,1 \pm 4,6$ года; 13 – активные курильщики, 5 – экс-курильщики; объем форсированного выдоха за 1-ю секунду – $57,4 \pm 22,7$ %_{долж.}) отмечено ≥ 2 положительных критериев по *Antho-nisen*, что свидетельствует об обострении заболевания; в 10 (56 %) случаях диагностировано среднетяжелое, в 8 (44 %) – тяжелое течение заболевания. На амбулаторном этапе пациенты получали базисную терапию (М-холинолитики и β_2 -симпатомиметики длительного действия), бронхолитические препараты короткого действия – по потребности), а 9 (53 %) больных ХОБЛ – ингаляционные глюкокортикостероиды в составе комбинированного препарата в средних и высоких дозах.

У пациентов с внебольничной пневмонией ($n = 13$: 7 мужчин, 6 женщин; средний возраст – $36,2 \pm 12,2$ года; 4 – курильщики, 2 – экс-курильщики, 7 – никогда не курили) отмечено острое начало заболевания; в 9 (69 %) случаях диагностировано среднетяжелое, у 4 (31 %) – тяжелое течение.

У лиц с НМРЛ ($n = 26$; 21 мужчина, 5 женщин, средний возраст – $56,5 \pm 12,3$ года; 14 – курильщики, 6 – экс-курильщики, 6 – никогда не курили) диагноз установлен в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Гистологически наиболее часто верифицировался плоскоклеточный рак (43 %) и аденокарцинома (23 %).

У здоровых некурящих добровольцев в возрасте от 20 до 45 лет ($n = 24$; 14 мужчин, 10 женщин; средний возраст – $32,6 \pm 6,9$ года) отмечались нормальные показатели легочной функции; в анамнезе отсутствовали указания на аллергические реакции, хронические заболевания органов дыхания, других органов и систем, а также острые респираторные симптомы в течение последних 2 мес.

Сбор КВВ проводился стандартизованным методом в течение 10 мин с помощью аппарата *ECoScreen (VIASYS Healthcare, Германия)*, конструкция которого предотвращает контаминацию слюны. Особое

внимание уделялось исключению носового дыхания (с помощью носового зажима) и белкового загрязнения КВВ слюной. Для исключения этого определялось присутствие в спектрах белка α -амилазы. Собранные образцы КВВ переносились в устойчивые к низким температурам полипропиленовые эппендорфы с поверхностью, обладающей низкосорбционной способностью в отношении белков; образцы хранились в морозильной камере при $-85^{\circ}\text{C} \leq 1$ мес. **Идентификация белков КВВ.** Аликвота КВВ (объем около 1 мл) переносилась в устойчивые к низким температурам полипропиленовые пробирки с поверхностью, обладающей низкосорбционной способностью в отношении белков, и лиофилизировалась до полного высыхания. Затем образцы КВВ подвергались гидролизу модифицированным трипсином (*Promega*, США), добавленным в соотношении фермент / белок 1 : 100 (по массе) в 0,05 М NH_4HCO_3 буфер (рН – 8,0) при 30°C . Реакция останавливалась после 20 ч инкубации добавлением 2 мкл 1%-ного раствора муравьиной кислоты [17]. Полученный раствор анализировался с помощью нанопоточной высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС / МС).

Эксперименты ВЭЖХ-МС / МС проводились при использовании системы, состоящей из хроматографа *Agilent 1100* (*Agilent Technologies Inc.*, Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра *LTQ-FT Ultra* (*Thermo*, Бремен, Германия) – масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса (ИЦР), совмещенного с линейной квадрупольной ионной ловушкой, используемой для накопления ионов и измерения спектров столкновительно-индуцированной фрагментации (МС / МС) ионов. Объем вводимой на колонку пробы составлял 1 мкл, использовалась колонка $75 \text{ мкм} \times 12 \text{ см}$ с фазой *Reprosil-Pur Basic C18*, 3 мкм (*Dr. Maisch HPLC GmbH*, Аммербух-Энтринген, Германия), изготовленная в лаборатории по методике Манна и др. [18]. В качестве подвижной фазы использовались растворитель А – 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в H_2O -НСООН (1 000 : 1 по объему), растворитель В – 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в CH_3CN -НСООН (1 000 : 1 по объему). Проводилась градиентная хроматография с линейным увеличением относительного содержания растворителя В в потоке от 3 до 50 % за 40 мин. Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществлялся при помощи программы *Xcalibur* (*Thermo Electron*, Бремен, Германия) в 2-стадийном режиме автоматического измерения спектров. На 1-й стадии в масс-спектрометре ИЦР измерялись точные массы пептидов в диапазоне m/z 300–1 600 с разрешением $R = 50\,000$ для m/z 400 (число ионов в ячейке ИЦР 5×10^6). На 2-й стадии из ИЦР-масс-спектра выбирались 3 максимальных пика, для которых производилась столкновительно-индуцированная фрагментация.

Список точных масс пептидов и масс их фрагментов использовался для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы

Mascot, version 2.0.04 (*Matrix Science*, Лондон, Великобритания). Для идентификации белков использовалась база данных *IPI-human, version 3.82* (выпущено 06.04.11; 92 104 записи), предоставляемая Европейским институтом биоинформатики (www.matrix-science.com). Для идентификации белков использовались следующие параметры поиска: фермент – трипсин; точность масс для родительского иона – 5 ppm; точность масс для MS / MS-фрагментов – 0,50 Да; модификации – окисление метионина. Считалось, что белок достоверно идентифицирован, если для него нашлось ≥ 1 уникального пептида, достоверно идентифицирован – если для него нашлось ≥ 2 уникальных пептидов ($Score > 70$) у одного из доноров или если данный белок при наличии ≥ 1 уникального пептида ($Score > 30$) нашелся в образцах нескольких доноров [19].

Для аннотирования и анализа результатов использовались биоинформатические базы данных *GeneCards* (<http://www.genecards.org>), *Gene Ontology* (GO) (<http://geneontology.org>), *MOPEd* (<https://www.protein-spire.org/MOPEd>), *BioGPS* (<http://biogps.org>), *UniProt* (<http://www.uniprot.org>), а также продукты компании *Qiagen* (<http://www.qiagen.com>) для профилирования различных физиологических и патологических процессов в организме человека.

Результаты и обсуждение

При протеомном анализе образцов КВВ обследованных доноров 4 групп выявлено > 300 различных белков. Инвариантными для всех проб являлись цитоскелетные кератины II (СК 1–6) и I (СК 9, 10, 14–16) типов. В предварительных экспериментах показано, что цитоскелетные кератины являются основными белковыми компонентами КВВ как у курильщиков, так и у некурящих здоровых людей [17, 20]. 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 в КВВ являются свободноциркулирующими белками воздуха [17].

Полный список некератиновых белков, идентифицированных в образцах КВВ у здоровых добровольцев, пациентов с ХОБЛ и пневмонией, приведен в табл. 1.

Как видно из табл. 1, для здоровых людей и пациентов с ХОБЛ и пневмонией оказались характерны 23 белка. Среди них наибольшей частотой встречаемости в пробах характеризовался дермцидин – белок-антибиотик, обладающий антибактериальной и протеолитической активностью. Известно, что дермцидин секретируется потовыми железами человека [21]. Однако в ряде исследований показано, что дермцидин и его производные пептиды обнаруживались также в крови при остром инфаркте миокарда [22], в плаценте [23], головном и спинном мозге [24]. Согласно базе данных MOPEd, экспрессия дермцидина наб-

Таблица 1

Белки, идентифицированные в образцах конденсата выдыхаемого воздуха у здоровых добровольцев, больных хронической обструктивной болезнью легких и пневмонией

Table 1

Proteins identified in EBC samples of healthy volunteers and of patients with chronic obstructive pulmonary disease and pneumonia

Ген	Белок	Краткое описание белка (на основании базы данных GeneCards)
ACTG1	Цитоплазматический актин	Белок цитоскелета
AGP2	α_1 -Кислый гликопротеин-2	Транспортный белок кровотока модулирует активность иммунной системы в ходе реакции на острую фазу воспаления (иммуносупрессор)
ALB	Сывороточный альбумин	Транспортный белок, основной белок плазмы крови
AMBP	Предшественник α_1 -микроглобулина / бикунина	Предшественник, который в ходе протеолиза образует 2 функционально разных белка – α_1 -микроглобулин, принадлежащий к семейству транспортных белков липокалинов и играющих роль в регуляции воспалительного процесса, и бикунин, относящийся к семейству ингибиторов протеаз Куница
AZGP1	Цинк- α_2 -гликопротеин	Белок экспрессируется в плазме крови, эпителии, поте, слюне, стимулирует распад жиров
CDSN	Корнеодесмосин	Экспрессируется преимущественно в эпидермисе и играет роль в слущивании ороговевшего слоя кожи
CSTA	Цистатин А	Ингибитор лизосомальных цистеиновых протеаз – катепсинов, которые, в свою очередь, участвуют в обработке и представлении антигенов при воспалительных и онкологических заболеваниях, индуцируют синтез фактора некроза опухоли и интерлейкина-10, стимулируют образование оксида азота
DCD	Дермцидин	Белок-антибиотик, обладающий антибактериальной и протеолитической активностью
DMKN	Дермокин	Экспрессируется в коже, регулирует дифференциацию кератиноцитов
DNAH14	Динеин аксонемный, тяжелая цепь 14	Белок ресничек респираторного тракта
DSP	Десмоплакин, изоформа DPI	Основной компонент десмосом
FLG2	Филаггрин-2	Белок, участвующий в процессах ороговевания кожи и имеющий некоторую антимикробную активность
HRNR	Хорнерин	Белок, участвующий в процессах ороговевания кожи
IGHA1	Тяжелая цепь иммуноглобулина- α_1	Основной класс секретируемых иммуноглобулинов
JUP	Соединение плакоглобина	Основной компонент десмосом и других межклеточных соединений
KNG1	Кининоген-1, изоформа HMW	Секретируемый белок плазмы крови, принимающий участие во многих физиологических процессах
LCN1	Липокалин-1	Транспортный белок, экспрессируется в слюнных железах и трахее
LYZ	Лизоцим С	Белок с антибактериальной активностью, широко представленный в различных тканях и органах
PIP	Пролактин-индуцируемый белок	Белок, связанный, по некоторым данным, с транспортом сахаров и рядом сигнальных путей
PTGDS	Простагландин- H_2 D-изомераза	Белок, катализирующий конверсию простагландина H_2 в простагландин D_2 . Участвует в сокращении гладкой мускулатуры, ингибитор агрегации тромбоцитов
SHROOM3	SHROOM-родственный 3 белок	Принадлежит к семейству SHROOM-подобных белков. Участвует в регуляции формы клеток
SPP1	Остеопонтин, изоформа А	Действует как цитокин и участвует в реакциях первичного иммунного ответа
TXN	Тиоредоксин	Участник различных окислительно-восстановительных реакций

людается во многих тканях, включая респираторный тракт (<https://www.proteinspire.org/MOPED/mopedviews/proteinExpressionDatabase.jsf?organismId=Human&proteinId=P81605>).

В связи с этим интересно отметить, что в группах здорового контроля и ХОБЛ дермцидин являлся практически инвариантным (частота встречаемости в пробах 96 и 94 % соответственно), тогда как в группе с пневмонией встречаемость этого белка составляет лишь 60 %. Безусловно, при дальнейшем наборе статистики по заболеванию, применении количественных методов определения уровня экспрессии данного белка и последующего анализа причин снижения частоты идентификации дермцидина у пациентов с внебольничной пневмонией требуется подтверждение этих данных.

При проведении ряда исследований по онкологическим заболеваниям дермцидин предложен в качестве вероятного онкогена [25]. Показано также, что он стимулирует пролиферацию опухолевых клеток мыши, крысы и человека [25, 26].

Приблизительно с одинаковой частотой в группах здоровых добровольцев и больных ХОБЛ и пневмонией идентифицировались такие белки, как иммуноглобулин- α , кининоген, цитоплазматический актин, сывороточный альбумин, цинк- α_2 -гликопротеин, лизоцим.

На рис. 1 представлены данные по частоте обнаружения в образцах КВВ белков, идентифицированных в группах здоровых добровольцев, больных ХОБЛ и пневмонией. Однако частота встречаемости этих белков в пробах здоровых доноров значимо отличалась от таковой в группах пациентов с ХОБЛ и пневмонией, поэтому с целью выявления причин таких расхождений и оценки возможной диагностической значимости данных белков требуется дальнейшее изучение этих данных.

Среди представленных данных интересно отметить резкое снижение количества идентификаций предшественника α_1 -микроглобулина / бикунина с > 80%-ной идентификаций этого белка в пробах у здоровых добровольцев до порядка 10%-ной иден-

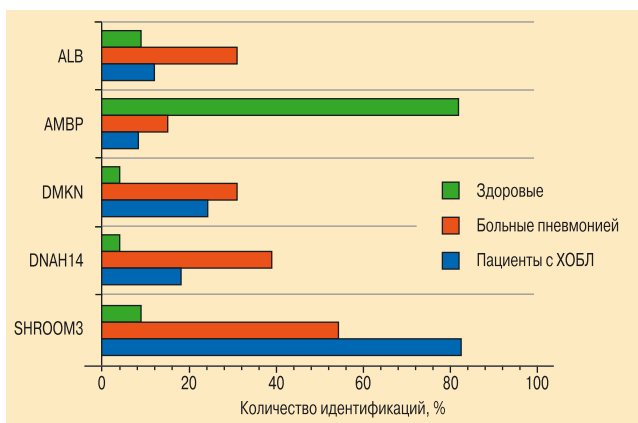


Рис. 1. Соотношение количества идентификаций белков, характерных для протеомов конденсата выдыхаемого воздуха у здорового контроля, больных хронической обструктивной болезнью легких и пневмонией; %

Figure 1. Proportion of identified proteins typical for the proteome of exhaled breath condensate in healthy subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease and pneumonia; %

тификаций в образцах КВВ у больных ХОБЛ и пневмонией. Поскольку α_1 -микроглобулин ингибирует иммунные функции лейкоцитов *in vitro*, его распределение связывают с защитной и противовоспалительной ролью *in vivo* [27], а бикунин репрессируется при воспалении [28], можно предположить, что острое воспаление, наблюдаемое при ХОБЛ и пневмонии, может вызывать снижение экспрессии пред-

шественника α_1 -микроглобулина / бикунина. В свою очередь, при уменьшении содержания белка затрудняется его определение в пробах КВВ.

Для белка SHROOM3 наблюдается обратная динамика, характеризующаяся резким возрастанием количества идентификаций в пробах КВВ у больных ХОБЛ и пневмонией по сравнению со здоровыми добровольцами. Аналогичная обратная динамика (с менее выраженным ростом числа идентификаций) характерна также для динеина и дермокина. Интересно, что SHROOM3 и динеин являются компонентами цитоскелета и связаны с микротрубочками, однако о дермокине в доступной литературе информации недостаточно. У этого белка открыто 4 изоформы, 3 из которых экспрессируются в коже и участвуют в дифференцировке кератиноцитов, а 4-я изоформа распространена повсеместно [29]. Кроме того, есть данные, что при воспалительной реакции уровень экспрессии дермокина повышается [30].

На рис. 2 представлены данные по частоте идентификаций белков, характерных для здоровых добровольцев и одной из групп – ХОБЛ и пневмонии, но по разным причинам не идентифицированным для другой группы.

Как видно из рис. 2, в образцах КВВ у здоровых людей и больных ХОБЛ идентифицированы 10 белков, но в пробах больных пневмонией таковые от-

Таблица 2
Белки, идентифицированные в конденсате выдыхаемого воздуха больных хронической обструктивной болезнью легких
Table 2
Proteins identified in EBC samples of patients with chronic obstructive pulmonary disease

Буквенное обозначение гена	Название белка
ATP1A3	Натрий / калиевая аденозинтрифосфатаза, субъединица α_3
CD3EAP	ДНК-направленная РНК-полимераза I, субъединица RPA34
COL1A1	Коллаген α_1 , (I) цепь
EIF2S1	Эукариотический фактор инициации трансляции 2, субъединица 1
GPR179	Рецептор G-белка 179
HBB	Гемоглобин, субъединица β
HBG1	γ -Глобин
HTRA2	Митохондриальная сериновая протеаза HTRA2, изоформа 1
LACRT	Внеклеточный гликопротеин лакритин
NOC4L	Ядрышковый сложный белок 4, гомолог
NT5C1B	Цитозольная 5'-нуклеотидаза 1B, изоформа 2
OSBPL8	Оксистерол-связывающий белок
PDE8B	Высокоаффинная цАМФ-специфичная и ИБМК-нечувствительная 3',5'-циклическая фосфодиэстераза 8B, изоформа 3
PRDX1	Пероксиредоксин-1
SHBG	Глобулин, связывающий половые гормоны
TFAP2D	Фактор транскрипции AP-2 δ
TLE2	Трансдукцин-подобный белок-энхансер 2
UBA6	Убиквитин-подобный модификатор-активирующий фермент 6, изоформа 1
ZMYND8	Протеинкиназа C-связывающий белок 1, изоформа 8

Примечание: цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; ИБМК – изобутил-метилксантин.

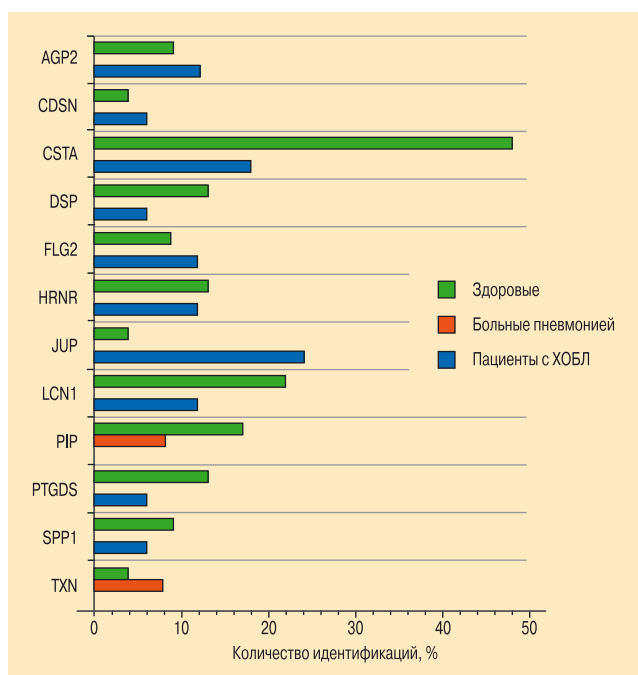


Рис. 2. Соотношение количества идентификаций белков, характерных для протеомов конденсата выдыхаемого воздуха у здоровых добровольцев, пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и пневмонией; %

Figure 2. Proportion of number of identified proteins typical for the proteome of exhaled breath condensate in healthy subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease and pneumonia; %

существовали; напротив, 2 белка обнаружены только у здоровых добровольцев и у больных пневмонией, но не обнаружены в пробах больных ХОБЛ.

В табл. 2 приведен список некератиновых белков, идентифицированных только в пробах у пациентов с ХОБЛ, но отсутствовавших в протеомах КВВ у здоровых людей и больных пневмонией.

Согласно приведенным данным, образцы КВВ у больных ХОБЛ характеризовались наличием крови (в 2 пробах из 17 обнаружен гемоглобин) и обширной группы ядерных белков, появление которых свидетельствует о процессе разрушения ткани. Кроме того, интересно отметить наличие в КВВ пероксиредоксина (против тиоредоксина у здорового контроля и больных пневмонией). Известно, что белок тиоредоксин вырабатывается в ответ на внутриклеточный оксид азота (NO), ингибирует каспазу-3 и стимулирует активность фактора транскрипции. В свою очередь, пероксиредоксин вырабатывается в результате окислительного стресса [31].

В табл. 3 приведен список некератиновых белков, идентифицированных в образцах КВВ у больных пневмонией и отсутствовавших в пробах здоровых добровольцев и пациентов с ХОБЛ.

Из 40 некератиновых белков, идентифицированных в образцах КВВ у пациентов с ХОБЛ и пневмонией и не характерных для здоровых, выявлен только 1 общий белок – *Collagen alpha-1(XVIII) chain* – ингибитор пролиферации клеток эндотелия и ангиогенеза. Частота идентификаций этого белка в пробах КВВ в обеих группах была примерно одинакова и составила примерно 30 % общего числа образцов

для каждой группы. Еще одно общее свойство протеомов ХОБЛ и пневмонии – наличие в их составе цАМФ-специфической 3',5'-циклической фосфодиэстеразы, которая стимулирует продукцию интерлейкинов и интерферонов.

У больных НМРЛ основную часть (65 %) идентифицированных белков также составили белки кератиновой группы, в т. ч. кератины цитоскелетные I (СК 1, 2, 5, 6А) и II (СК 9, 10, 14, 16, 17) типов, а также группа транспортных белков (сывороточный альбумин, липокалин-1). Обнаружено значительно более высокое содержание некоторых кератинов (СК 5, 6, 14) в КВВ у онкологических больных по сравнению со здоровым контролем ($p < 0,05$). Ранее методом ELISA получены данные о высокой распространенности СК-6 при плоскоклеточном раке ($p < 0,001$) и аденокарциноме ($p = 0,004$) по сравнению с бронхиальным эпителием [32]. Таким образом, цитокератины 5, 6 и 14 могут быть предложены в качестве диагностической панели, однако для определения роли этих белков в патогенезе РЛ необходимо проведение дальнейших исследований.

Среди белков некератиновой природы, достоверно идентифицированных у 30 % здоровых доноров, следует отметить простагландин-Н2D-изомеразу –

Таблица 3
Белки, идентифицированные в образцах конденсата выдыхаемого воздуха у больных пневмонией
Table 3
Proteins identified in EBC samples of patients with pneumonia

Ген	Белок
ACTA2	Актин, гладкая мускулатура аорты
ANXA1	Аннексин А1
ANXA2	Аннексин А2
BAG6	Изоформа 2 большого пролин-обогащенного белка BAT3
CRNN	Корнулин
CST6	Цистатин М
CSTB	Цистатин В
EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста, изоформа 1
*	Гистоны H2B
HSP90B1	Белок теплового шока HSP 90-β
KMT2D	MLL2 564 кДа белок
LAMA1	Ламинин, субъединица α ₁
**	LOC100129958-подобный hCG1643231
**	LOC100292594-, LOC100288670-, LOC100290955-гипотетический белок XP_002342097
PDE4D	Высокоаффинная цАМФ-специфичная и ИБМК-нечувствительная 3',5'-циклическая фосфодиэстераза-4D, изоформа 6
PRSS3	Сериновая протеаза 4, изоформа В
S100A8	Белок S100-A8
SMCHD1	Поддерживающий структуру хромосом гибкий домен-содержащий белок, изоформа 1
SPRR3	Малый пролин-обогащенный белок 3
ZG16B	Белок зимогенной гранулы 16, гомолог В

Примечание: цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; ИБМК – изобутил-метилксантин; * – идентифицированы фрагменты белков семейства гистонов H2B; ** – гипотетические белки на основании данных секвенирования генома человека.
Notes. *, identified protein fragments of histone H2B family; **, proteins hypothesized according to the human genome sequencing.

медиатор аллергических и воспалительных процессов, который опосредует хемотаксис эозинофилов и базофилов в тканях легких [33], а также кининоген – ингибитор тиоловых протеаз, играющих важную роль в свертывании крови. В 20 % образцов КВВ у здоровых доноров определены пептиды, характерные для белка COP9 сигнасомы (CSN). Ранее у млекопитающих установлено, что CSN играет важную роль в таких клеточных процессах, как сигнальная трансдукция, прогрессия клеточного цикла, транскрипция генов, выживание клеток и репарация ДНК. CSN функционирует в качестве посредника между клеточными сигналами и положительной регуляцией убиквитин-зависимой деградации белков [34]. Низкий уровень этого белка в КВВ онкологических больных может быть связан с дисфункцией убиквитиновой защиты в раковых клетках.

В протеомах КВВ у пациентов с НМРЛ идентифицирован белок POTEЕ (POTE *ankyrin domain family, member E*), обнаруженный в предыдущих исследованиях у > 60 % больных с НМРЛ I–II стадии. Ранее показано, что появление POTEЕ характерно для многих видов рака. В последующих исследованиях экспрессии данного белка, в т. ч. при РЛ, подтверждена его перспективность как маркера опухоли, и POTEЕ предложен в качестве мишени при разработке «противораковой вакцины» [35].

В КВВ у больных РЛ также определены следующие белки: β - и α -субъединицы гемоглобина, серин / аргинин-богатый фактор сплайсинга-1, ядерный убиквитиновый казеин (NUCKS), белки группы высокой мобильности HMG-I / HMG-Y и цДНК FLJ78440, сходная с лактоферрином.

Семейство HMG-I / Y белков принадлежит к группе негистоновых белков с высокой электрофоретической подвижностью – HMG (группа высокой мобильности). Белки группы HMG-I / Y изменяют структуру ДНК, облегчая белок-белковые взаимодействия в преинициативном транскрипционном комплексе на АТ-богатых последовательностях индивидуальных генов. В исследованиях на мышах показано, что сверхэкспрессия клетками HMG-I / Y белков приводит к онкологической трансформации [36]. Однако молекулярные механизмы, которые обеспечивают сверхэкспрессию белка в раковых клетках, по-прежнему остаются неясными [37].

Известно, что уровень лактоферрина повышается при различных воспалительных заболеваниях. Увеличение содержания лактоферрина обнаружено у пациентов с хроническими гиперплазиями, раком различной локализации и лимфопролиферативными заболеваниями. Например, у женщин продемонстрирована сверхэкспрессия лактоферрина и матричной РНК в злокачественной аденокарциноме эндометрия по сравнению с нормальными эпителиальными клетками [38]. Таким образом, потенциал определения уровня лактоферрина в качестве маркера опухоли достаточно убедителен.

Белок гемоглобин идентифицирован в КВВ у 8 больных. При сравнении клинических характеристик этих пациентов показано более тяжелое течение

онкологического заболевания по сравнению с другими больными. Также у этих пациентов можно предположить наличие легочного кровотечения.

Среди белков, обнаруживаемых в КВВ у онкологических больных, идентифицирован ядерный убиквитиновый казеин (NUCKS), являющийся ядерным ДНК-связывающим широкоэкспрессируемым белком, высокий уровень содержания которого выявлен в щитовидной и предстательной железах, матке, печени плода, тимусе и легких.

В настоящее время биологическая функция NUCKS плохо изучена. Тем не менее распространение NUCKS в быстрорастущих клетках предполагает, что этот белок может быть вовлечен в продвижение и поддержание активности транскрипции некоторых генов, что приводит к быстрой пролиферации и раку.

Недавно *P.Ziolkowski et al.* при анализе экспрессии NUCKS в клетках карциномы молочной железы обнаружен ее высокий уровень при различных поражениях, в т. ч. при базальном и плоскоклеточном раке. Выдвинуто предположение, что NUCKS может использоваться в качестве нового потенциального биомаркера злокачественности опухоли [39].

Заключение

В данном исследовании показано, что в образцах КВВ у здоровых добровольцев, больных ХОБЛ, пневмонией и РЛ, выявлен характерный белковый спектр. Анализ КВВ является информативным методом и обладает большим потенциалом в качестве метода диагностики респираторных заболеваний, поскольку позволяет установить отличия не только между здоровыми людьми и больными с патологией легких, но и между разными заболеваниями, например ХОБЛ и пневмонией.

Большинство выявленных белков (цитокератины 5, 6 и 14, β - и α -субъединицы гемоглобина, POTEЕ и т. п.) могут быть предложены в качестве панели для диагностики РЛ. Однако с целью изучения их диагностической значимости и роли в патогенезе РЛ требуется проведение дальнейших исследований.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует. Исследование проводилось без участия спонсоров.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest. This study was not sponsored.

Литература

1. Konstantinidi E.M., Lappas A.S., Tzortzi A.S., Behrakis P.K. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *Scientific World Journal*. 2015; 2015: 435160. DOI: 10.1155/2015/435160.
2. Borrill Z.L., Roy K., Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur. Respir. J.* 2008; 32 (2): 472–486. DOI: 10.1183/09031936.00116107.
3. Bloemen K., Hooberghs J., Desager K. et al. Non-invasive biomarker sampling and analysis of the exhaled breath proteome. *Proteomics Clin. Appl.* 2009; 3 (4): 498–504. DOI: 10.1002/prca.200800095.

4. Lin J.L., Bonnicksen M.H., Nogeh E.U. et al. Proteomics in detection and monitoring of asthma and smoking-related lung diseases. *Exp. Rev. Proteomics*. 2010; 7 (3): 361–372. DOI: 10.1586/ep.10.9.
5. Lim M.Y., Thomas P.S. Biomarkers in exhaled breath condensate and serum of chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer. *Int. J. Chronic Dis*. 2013; 2013: 578613. DOI: 10.1155/2013/578613.
6. Nobakht M., Gh B.F., Aliannejad R., Rezaei-Tavirani M. et al. The metabolomics of airway diseases, including COPD, asthma and cystic fibrosis. *Biomarkers*. 2015; 20 (1): 5–16. DOI: 10.3109/1354750X.2014.983167.
7. Terracciano R., Pelaia G., Preianò M., Savino R. Asthma and COPD proteomics: current approaches and future directions. *Proteomics Clin. Appl.* 2015; 9 (1–2): 203–220. DOI: 10.1002/prca.201400099.
8. Czitrovsky A., Szymanski W., Nagy A., Jani P. A new method for the simultaneous measurement of particle size, complex refractive index and particle density. *Meas Sci. Technol.* 2002; 13: 303–308.
9. Horvath I., Lazar Z., Gyulai N. et al. Exhaled biomarkers in lung cancer. *Eur. Respir. J.* 2009; 34 (1): 261–275. DOI: 10.1183/09031936.00142508.
10. Lee Y.T., Chen S.C., Shyu L.Y. et al. Significant elevation of plasma cathepsin B and cystatin C in patients with community-acquired pneumonia. *Clin. Chim. Acta.* 2012; 413 (5–6): 630–635. DOI: 10.1016/j.cca.2011.12.010.
11. Buszewski B., Kesy M., Ligor T., Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr.* 2007; 21 (6): 553–566.
12. Conrad D.H., Goyette J., Thomas P.S. Proteomics as a method for early detection of cancer: a review of proteomics, exhaled breath condensate, and lung cancer screening. *J. Gen. Intern. Med.* 2008; 23 (Suppl. 1): 78–84. DOI: 10.1007/s11606-007-0411-1.
13. Horvath I., Hunt J., Barnes P.J. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.* 2005; 26 (3): 523–548.
14. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких. Пересмотр 2014 года. Доступно на: http://goldcopd.org/wp-content/uploads/2016/04/GOLD_Report_Russian_2014.pdf
15. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С. и др. Российское респираторное общество (РРО). Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ). Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. *Пульмонология*. 2014; (4): 13–48.
16. Бычков М.Б., Горбунова В.А. Ассоциация онкологов России. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком легкого. М.; 2014. Доступно на: <http://oncology-association.ru/docs/recomend/may2015/19vz-rek.pdf>
17. Kurova V., Anaev E., Kononikhin A. et al. Proteomics of exhaled breath: methodological nuances and pitfalls. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009; 47 (6): 706–712. DOI: 10.1515/CCLM.2009.166.
18. Ishihama Y., Rappsilber J., Andersen J.S., Mann M. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J. Chromatogr. A*. 2002; 979 (1–2): 233–239.
19. Nesvizhskii A., Keller A., Kolker E., Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2003; 75 (17): 4646–4658.
20. Hoffmann H., Tabaksblat L., Enghild J., Dahl R. Human skin keratins are the major proteins in exhaled breath condensate. *Eur. Respir. J.* 2008; 31 (2): 380–384. DOI: 10.1183/09031936.00059707.
21. Schitteck B., Hipfel R., Sauer B. et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* 2001; 2 (12): 1133–1137.
22. Ghosh R., Maji U.K., Bhattacharya R., Sinha A.K. The role of dermcidin isoform 2: a two-faceted atherosclerotic risk factor for coronary artery disease and the effect of acetylsalicylic acid on it. *Thrombosis*. 2012; 2012: 987932. DOI: 10.1155/2012/987932.
23. Lee Motoyama J.P., Kim-Motoyama H., Kim P. et al. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 357(4): 828–833.
24. Cunningham T.J., Hodge L., Speicher D. et al. Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin. *J. Neurosci.* 1998; 18: 7047–7060.
25. Stewart G.D., Skipworth R.J., Pennington C.J. et al. Variation in dermcidin expression in a range of primary human tumours and in hypoxic/oxidatively stressed human cell lines. *Br. J. Cancer*. 2008; 99 (1): 126–132. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604458.
26. Yano C.L., Ventrucci G., Field W.N. et al. Metabolic and morphological alterations induced by proteolysis-inducing factor from Walker tumour-bearing rats in C2C12 myotubes. *BMC Cancer*. 2008; 8: 24. DOI: 10.1186/1471-2407-8-24.
27. Urade Y., Hayaishi O. Prostaglandin D synthase: Structure and function. *Vitam. Horm.* 2000; 58: 89–120.
28. Mizon C., Piva F., Queyrel V. et al. Urinary bikunin determination provides insight into proteinase / proteinase inhibitor imbalance in patients with inflammatory diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002; 40 (6): 579–586.
29. Leclerc E.A., Gazeilles L., Serre G. et al. The ubiquitous dermokine delta activates Rab5 function in the early endocytic pathway. *PLoS One*. 2011; 6 (3): e17816. DOI: 10.1371/journal.pone.0017816.
30. Hasegawa M., Higashi K., Yokoyama C. et al. Altered expression of dermokine in skin disorders. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2013; 27 (7): 867–875. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2012.04598.x.
31. Kinnula V.L., Vuorinen K., Puumets H. et al. Thiol proteins, redox modulation and parenchymal lung disease. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14 (2): 213–222.
32. Poschmann G., Sitek B., Sipos B. et al. Identification of proteomic differences between squamous cell carcinoma of the lung and bronchial epithelium. *Mol. Cell Proteomics*. 2009; 8 (5): 1105–1116. DOI: 10.1074/mcp.M800422-MCP200.
33. Spik I., Brenuchon C., Angeli V. et al. Activation of the prostaglandin D2 receptor DP2/CRTH2 increases allergic inflammation in mouse. *J. Immunol.* 2005; 174 (6): 3703–3708.
34. Wei N., Deng X.W. The COP9 signalosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003; 19: 261–286. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.112449.
35. Wang Q., Li X., Ren S. et al. Serum levels of the cancer-testis antigen POTEE and its clinical significance in non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 2015; 10 (4): e0122792. DOI: 10.1371/journal.pone.0122792.
36. Wood L., Maher J., Bunton T., Resar L. The oncogenic properties of the HMG-I gene family. *Cancer Res*. 2000; 60 (15): 4256–4261.

37. Resar L. The high mobility group A1 gene: transforming inflammatory signals into cancer? *Cancer Res.* 2010; 70 (2): 436–439. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1212.
38. Walmer D., Padin C., Wrona M. et al. Malignant transformation of the human endometrium is associated with over-expression of lactoferrin messenger RNA and protein. *Cancer Res.* 1995; 55: 1168–1175.
39. Ziolkowski P., Wozniak M., Dus K., Wisniewski J. The NUCKS: A novel tumor biomarker. *J. Mol. Biomark. Diagn.* 2013; 4 (145): 1000145.

Поступила 31.01.17

References

1. Konstantinidi E.M., Lappas A.S., Tzortzi A.S., Behrakis P.K. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects. *Scientific World Journal.* 2015; 2015: 435160. DOI: 10.1155/2015/435160.
2. Borrill Z.L., Roy K., Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur. Respir. J.* 2008; 32 (2): 472–486. DOI: 10.1183/09031936.00116107.
3. Bloemen K., Hooyberghs J., Desager K. et al. Non-invasive biomarker sampling and analysis of the exhaled breath proteome. *Proteomics Clin. Appl.* 2009; 3 (4): 498–504. DOI: 10.1002/prca.200800095.
4. Lin J.L., Bonnicksen M.H., Nogeh E.U. et al. Proteomics in detection and monitoring of asthma and smoking-related lung diseases. *Exp. Rev. Proteomics.* 2010; 7 (3): 361–372. DOI: 10.1586/ep.10.9.
5. Lim M.Y., Thomas P.S. Biomarkers in exhaled breath condensate and serum of chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer. *Int. J. Chronic Dis.* 2013; 2013: 578613. DOI: 10.1155/2013/578613.
6. Nobakht M., Gh B.F., Aliannejad R., Rezaei-Tavirani M. et al. The metabolomics of airway diseases, including COPD, asthma and cystic fibrosis. *Biomarkers.* 2015; 20 (1): 5–16. DOI: 10.3109/1354750X.2014.983167.
7. Terracciano R., Pelaia G., Preiano M., Savino R. Asthma and COPD proteomics: current approaches and future directions. *Proteomics Clin. Appl.* 2015; 9 (1–2): 203–220. DOI: 10.1002/prca.201400099.
8. Czitrovszky A., Szymanski W., Nagy A., Jani P. A new method for the simultaneous measurement of particle size, complex refractive index and particle density. *Meas Sci. Technol.* 2002; 13: 303–308.
9. Horvath I., Lazar Z., Gyulai N. et al. Exhaled biomarkers in lung cancer. *Eur. Respir. J.* 2009; 34 (1): 261–275. DOI: 10.1183/09031936.00142508.
10. Lee Y.T., Chen S.C., Shyu L.Y. et al. Significant elevation of plasma cathepsin B and cystatin C in patients with community-acquired pneumonia. *Clin. Chim. Acta.* 2012; 413 (5–6): 630–635. DOI: 10.1016/j.cca.2011.12.010.
11. Buszewski B., Keszy M., Ligor T., Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr.* 2007; 21 (6): 553–566.
12. Conrad D.H., Goyette J., Thomas P.S. Proteomics as a method for early detection of cancer: a review of proteomics, exhaled breath condensate, and lung cancer screening. *J. Gen. Intern. Med.* 2008; 23 (Suppl. 1): 78–84. DOI: 10.1007/s11606-007-0411-1.
13. Horvath I., Hunt J., Barnes P.J. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.* 2005; 26 (3): 523–548.
14. Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Updated 2014. Available at: http://goldcopd.org/wp-content/uploads/2016/04/GOLD_Report_Russian_2014.pdf/ (in Russian).
15. Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S. et al. Russian Respiratory Society (RRS). Interregional Association on Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (IACMAC). Clinical Guidelines on Diagnosis, Treatment and Prevention of Severe Community-Acquired Pneumonia. *Pul'monologiya.* 2014; (4): 13–48 (in Russian).
16. Bychkov M.B., Gorbunova V.A. The Association of Oncologists of Russia. Clinical Guidelines on Diagnosis and Treatment of Patients with Lung Carcinomas. Moscow; 2014. Available at: <http://oncology-association.ru/docs/recomend/may2015/19vz-rek.pdf> (in Russian).
17. Kurova V., Анаев Э., Kononikhin A. et al. Proteomics of exhaled breath: methodological nuances and pitfalls. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009; 47 (6): 706–712. DOI: 10.1515/CCLM.2009.166.
18. Ishihama Y., Rappsilber J., Andersen J.S., Mann M. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J. Chromatogr. A.* 2002; 979 (1–2): 233–239.
19. Nesvizhskii A., Keller A., Kolker E., Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2003; 75 (17): 4646–4658.
20. Hoffmann H., Tabaksblat L., Enghild J., Dahl R. Human skin keratins are the major proteins in exhaled breath condensate. *Eur. Respir. J.* 2008; 31 (2): 380–384. 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): 1133–1137.
22. Ghosh R., Maji U.K., Bhattacharya R., Sinha A.K. The role of dermcidin isoform 2: a two-faceted atherosclerotic risk factor for coronary artery disease and the effect of acetyl salicylic acid on it. *Thrombosis.* 2012; 2012: 987932. DOI: 10.1155/2012/987932.
23. Lee Motoyama J.P., Kim-Motoyama H., Kim P. et al. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 357(4): 828–833.
24. Cunningham T.J., Hodge L., Speicher D. et al. Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin. *J. Neurosci.* 1998; 18: 7047–7060.
25. Stewart G.D., Skipworth R.J., Pennington C.J. et al. Variation in dermcidin expression in a range of primary human tumours and in hypoxic/oxidatively stressed human cell lines. *Br. J. Cancer.* 2008; 99 (1): 126–132. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604458.
26. Yano C.L., Ventrucci G., Field W.N. et al. Metabolic and morphological alterations induced by proteolysis-inducing factor from Walker tumour-bearing rats in C2C12 myotubes. *BMC Cancer.* 2008; 8: 24. DOI: 10.1186/1471-2407-8-24.
27. Urade Y., Hayaishi O. Prostaglandin D synthase: Structure and function. *Vitam. Horm.* 2000; 58: 89–120.
28. Mizon C., Piva F., Queyrel V. et al. Urinary bikunin determination provides insight into proteinase / proteinase inhibitor imbalance in patients with inflammatory diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002; 40 (6): 579–586.
29. Leclerc E.A., Gazeilles L., Serre G. et al. The ubiquitous dermokine delta activates Rab5 function in the early endocytic pathway. *PLoS One.* 2011; 6 (3): e17816. DOI: 10.1371/journal.pone.0017816.
30. Hasegawa M., Higashi K., Yokoyama C. et al. Altered expression of dermokine in skin disorders. *J. Eur. Acad.*

- Dermatol. Venereol.* 2013; 27 (7): 867–875. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2012.04598.x.
31. Kinnula V.L., Vuorinen K., Ilumets H. et al. Thiol proteins, redox modulation and parenchymal lung disease. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14 (2): 213–222.
 32. Poschmann G., Sitek B., Sipos B. et al. Identification of proteomic differences between squamous cell carcinoma of the lung and bronchial epithelium. *Mol. Cell Proteomics.* 2009; 8 (5): 1105–1116. DOI: 10.1074/mcp.M800422-MCP200.
 33. Spik I., Brenuchon C., Angeli V. et al. Activation of the prostaglandin D2 receptor DP2/CRTH2 increases allergic inflammation in mouse. *J. Immunol.* 2005; 174 (6): 3703–3708.
 34. Wei N., Deng X.W. The COP9 signalosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003; 19: 261–286. DOI:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.112449.
 35. Wang Q., Li X., Ren S. et al. Serum levels of the cancer-testis antigen POTEE and its clinical significance in non-small-cell lung cancer. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0122792. DOI: 10.1371/journal.pone.0122792.
 36. Wood L., Maher J., Bunton T., Resar L. The oncogenic properties of the HMG-I gene family. *Cancer Res.* 2000; 60 (15): 4256–4261.
 37. Resar L. The high mobility group A1 gene: transforming inflammatory signals into cancer? *Cancer Res.* 2010; 70 (2): 436–439. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1212.
 38. Walmer D., Padin C., Wrona M. et al. Malignant transformation of the human endometrium is associated with over-expression of lactoferrin messenger RNA and protein. *Cancer Res.* 1995; 55: 1168–1175.
 39. Ziolkowski P., Wozniak M., Dus K., Wisniewski J. The NUCKS: A novel tumor biomarker. *J. Mol. Biomark. Diagn.* 2013; 4 (145): 1000145.

Received January 31, 2017