

УДК 616.24-008.7-072:577.112

## БЕЛКИ, ПЕПТИДЫ И АМИНОКИСЛОТЫ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА КАК МАРКЕРЫ БРОНХО-ЛЕГОЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Фёдоров В.И., Карапузиков А.А., Старикова М.К.

ООО «Специальные технологии», г. Новосибирск

### РЕЗЮМЕ

Представлен обзор современной литературы о содержании в выдыхаемом воздухе человека белков, пептидов и аминокислот. Описываются результаты применения методов протеомики и метаболомики для селективного детектирования отдельных белков, пептидов и аминокислот. Рассматриваются результаты исследования конденсата выдыхаемого воздуха и малых нелетучих эндогенных частиц. Описываются особенности содержания в выдыхаемом воздухе белков, пептидов и аминокислот при различных заболеваниях дыхательной системы. Показано, что обнаруживаемые вещества могут быть специфическими маркерами конкретных заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** протеомика, метаболомика, диагностика, маркеры заболеваний, бронхолегочная патология, белки, пептиды, аминокислоты.

### Введение

Достижения физики, химии и биологии во все времена были фундаментом для создания принципиально новых диагностических технологий. В частности, автор данной статьи имел отношение к адаптации микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии к одномоментному селективному определению стероидных гормонов в сыворотке крови и тканях [1], к использованию атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой для создания метода одномоментного селективного определения 17 микроэлементов в сыворотке крови [2], к применению терагерцевого лазера для создания метода раннего выявления тенденции к недостаточности иммунной системы у практически здоровых лиц [3], к созданию набора флуоресцирующих пептидов для определения активности ферментов [4] и т.д. Настоящая статья посвящена обзору литературы по диагностическим достижениям, основанным на применении методов протеомики и метаболомики для поиска адекватных маркеров бронхолегочных заболеваний в пробах выдыхаемого воздуха.

Поверхности альвеол легких и воздухоносных путей изобилуют различными веществами, в том числе макромолекулами, такими как пептиды и белки (цито-

кины, ферменты, антитела, регуляторные белки и т.д.). Они обнаруживаются среди анализируемых веществ. Пептиды и белки попадают в выдыхаемый воздух с поверхности слизистых оболочек как аэрозольные частицы вследствие турбулентного потока воздуха в бронхах и бронхиолах.

Человек выдыхает белки и пептиды эндогенного и экзогенного происхождения. К первым относятся белки и пептиды эпителиальных клеток дыхательных путей, а также продукты энзимной дефрагментации белков. Наличие экзогенных белков и пептидов обусловлено их попаданием в дыхательную систему извне во время вдоха [5]. Экзогенные белки также могут подвергаться действию эндогенных пептидаз.

При развитии патологических процессов в дыхательных путях может меняться уровень экспрессии эндогенных белков, характерных для физиологического состояния клеток, а также могут синтезироваться новые белки и пептиды. Особенно это характерно для процесса канцерогенеза. Изменение белкового состава обуславливает появление необычных пептидов в выдыхаемом воздухе в силу энзимного расщепления белков.

Наличие видоизмененных и вновь образованных белков и пептидов, а также изменение уровня содержания белков и пептидов, характерных для практически здоровых лиц, может иметь диагностическое значение. При этом белки и пептиды выдыхаемого воздуха выступают как специфические маркеры определенных заболеваний.

✉ Фёдоров Вячеслав Иванович, тел.: 8 (383) 336-48-56, 8-952-936-4390; e-mail: vif41@mail.ru

В составе выдыхаемого воздуха детектируются вещества, находящиеся в одном из трех агрегатных состояний: летучие низкомолекулярные вещества, вещества, растворенные в жидкой фазе, и вещества, входящие в состав малых аэрозольных частиц микронного и субмикронного масштаба размером менее 0,3 мкм. Их концентрация в пробах форсированного выдоха составляет от 1 до 10 000 на 1 л. Для анализа двух последних применяют метод сбора анализируемой пробы в виде конденсата выдыхаемого воздуха [6].

Пробы конденсата несут информацию о составе альвеолярной жидкости, уровне метаболизма в легких, состоянии сурфактантной системы легких. Выявлено, что диагностические возможности конденсата выдыхаемого воздуха высоки, концентрация определенных веществ в нем изменяется в соответствии со степенью выраженности изменений в легких и развивающейся в организме гипоксии [7].

В пробах конденсата обнаруживаются различные пептиды и белки. Первой работой, применившей методы протеомики для анализа интерлейкинов в конденсате выдыхаемого воздуха, стало исследование, проведенное Kullmann и соавт. [8]. Они анализировали 120 цитокинов в конденсате выдыхаемого воздуха здоровых лиц и больных аденокарциномой легкого. Только содержание 10 цитокинов более чем двукратно отличалось в пробах, полученных от больных, в том числе эотаксин, фактор роста фибробластов, интерлейкин-10 (ИЛ-10), макрофагальный воспалительный белок-3. У больных плоскоклеточным раком легкого отмечены достоверные отличия между пробами здоровых и больных по 13 цитокинам [9].

Методами протеомики было показано наличие в конденсате выдыхаемого воздуха больных бронхиальной астмой целой группы белков, относящихся к семейству цитокератинов. Наряду с ними были идентифицированы альбумин, актин, гемоглобин, лизоцим, дермцидин и кальгранулин В [10]. Цитокератины 2, 9 и 10 были обнаружены при острой легочной недостаточности и остром респираторном дистресс-синдроме [11]. При остром респираторном дистресс-синдроме обнаружены также ИЛ-1 и интерферон [12].

Fumagalli и соавт. идентифицировали 44 белка и пептида и тем самым расширили список веществ, детектируемых в выдыхаемом воздухе [13]. Среди них 34% составляют регуляторные и сигнальные белки и пептиды, 33% – структурные белки, 24% – провоспалительные цитокины, 6% – транспортные белки и 3% – ферменты. В пробах, полученных от больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и эмфиземой легких, цитокины доминировали (62%). Общее число сигнальных и регуляторных белков и пеп-

тидов, а также структурных белков составило лишь 15%. Различие между пробами этих двух групп пациентов состояло в присутствии ферментов, которые в пробах больных эмфиземой составили 8%, тогда как в пробах пациентов ХОБЛ ферменты отсутствовали полностью.

Наряду с этим для анализа пептидов в конденсате выдыхаемого воздуха широко применяется метод иммуноферментативного анализа. Предел обнаружения составляет от 0 до 3 пг/мл. В частности, высокая концентрация ИЛ-4 и ИЛ-13 в конденсате выдыхаемого воздуха обнаружена у пациентов с обострением бронхиальной астмы [14]. Показано также, что ИЛ-4 является значимым маркером для диагностики астмы и что при астме в выдыхаемом воздухе повышено содержание фактора некроза опухоли  $\gamma$  [15].

В конденсате выдыхаемого воздуха больных бронхиальной астмой обнаружены как провоспалительные интерлейкины (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-17,  $\gamma$ -интерферон, фактор некроза опухоли  $\alpha$ ), так и противовоспалительные интерлейкины (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13, трансформирующий ростовой фактор- $\beta$ ), а также такие хемокины, как хемоаттрактант моноцитов-1 и макрофагальный воспалительный белок-1 $\beta$  [16–19].

При обострении ХОБЛ резко увеличивается содержание всех этих веществ по сравнению со здоровыми людьми, тогда как при стабильном состоянии ХОБЛ только ИЛ-1 и ИЛ-12 достоверно отличаются от нормы [20].

Показано также, что при стабильной ХОБЛ снижен уровень хемокина GRO $\alpha$  (рострегулирующий онкоген) и не изменен уровень хемокина MCP-1 (моноцитарного хемоаттрактантного белка-1). При ухудшении состояния изменения уровня этих хемокинов не наблюдалось [21].

У больных муковисцидозом уровень ИЛ-8 в конденсате выдыхаемого воздуха умеренно повышен в стадии ремиссии, но при обострении заболевания его концентрация резко увеличивается.

Ichikawa и соавт. обнаружили в пробах конденсата выдыхаемого воздуха больных со стабильной бронхиальной астмой 40 цитокинов [22]. Показано, что у детей с бронхиальной астмой уровни цитокинов RANTES и ИЛ-4 значительно увеличиваются после физических упражнений [23].

Syslova и соавт. рассматривают ИЛ-4, ИЛ-6 и фактор некроза опухоли  $\alpha$  как надежные маркеры бронхиальной астмы [24]. Однако у больных немелкоклеточным раком легких в конденсате выдыхаемого воздуха также повышено содержание ИЛ-2, ИЛ-6 и фактора

некроза опухоли  $\alpha$ . Причем содержание этих веществ выражено коррелирует с тяжестью заболевания [25].

При воспалительных заболеваниях детектируются различные интерлейкины: ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12p70 и фактор некроза опухоли  $\alpha$ , являющиеся четкими индикаторами воспалительных реакций. Показано, что у больных с воспалением легких уровни всех исследованных интерлейкинов выше, чем у здоровых лиц [19].

Наряду с цитокинами и хемокинами в выдыхаемом воздухе содержатся различные белки, в частности С-реактивный белок [24, 26], являющийся маркером воспаления, муцин [27] и альбумин [27, 28]. Так, у больных немелкоклеточным раком легких в конденсате выдыхаемого воздуха повышено содержание лептина по сравнению со здоровыми субъектами [25]. Содержание эндотелина-1 также повышено [29, 30]. При этом оно наиболее высоко в IV стадии заболевания. Маркером бронхиальной астмы является гамма-интерферон [24].

Изменения в составе белков отражают воспалительные изменения в воздушных путях, вызванные астмой и инфекциями [31, 32]. В частности, у больных бронхиальной астмой содержание эндотелина-1 в конденсате выдыхаемого воздуха существенно выше, чем у здоровых лиц. При этом наиболее высокий уровень отмечен у больных с нестабильной тяжелой астмой по сравнению с больными со стабильной астмой умеренной тяжести [33]. Уровень эндотелина-1 повышается при бронхоконстрикции, индуцируемой физическими упражнениями [34].

У больных немелкоклеточным раком легких в конденсате выдыхаемого воздуха высокий уровень циклооксигеназы-2 и сурвивина по сравнению со здоровыми курильщиками и некурильщиками. Содержание этих веществ коррелирует со степенью прогрессирования болезни [35].

Для раннего распознавания рака легких используется определение в конденсате выдыхаемого воздуха белков – маркеров ангиогенеза (фактора роста эндотелия сосудов, фактора роста фибробластов и ангиогенина) [36]. Их содержание достоверно увеличено у пациентов со свежесобраным раком легких, тогда как при ХОБЛ оно не отличается от здоровых лиц. Надежным маркером рака легкого оказался белок дермцидин. Он детектируется в пробах конденсата выдыхаемого воздуха методом хроматомасс-спектрометрии у больных с верифицированными плоскоклеточным раком легких и аденокарциномой легких, но не мелкоклеточным раком легких [37].

В образцах конденсата, полученного от пациентов с онкозаболеваниями дыхательной системы различной

локализации, найдены внутри- и внеклеточные белки, а также нуклеосомные и мембранные белки, что говорит о глубокой деструкции клеток эпителия дыхательных путей. Так, наличие в списке белков гистонов (Histone H4, Histone H2B type 2-E, Histone H3.2) характеризует глубокий распад клеток, что может иметь место при онкологическом заболевании. Присутствие белка гемоглобина указывает на кровотечение в легочных тканях, характерное для тяжелого течения заболевания [38].

Наряду с этим у пациентов с раком легкого в конденсате выдыхаемого воздуха обнаружен белок KRAS, являющийся протоонкогеном, содержание которого снижается после хирургической резекции опухоли [39].

В последнее время стали применять сбор малых нелетучих эндогенных частиц с последующим их анализом [40]. В таких частицах, как и в конденсате выдыхаемого воздуха, обнаруживаются крупномолекулярные вещества, в том числе белки и пептиды. Это новый неинвазивный метод получения информации о составе нелетучего материала в выдыхаемом воздухе. Авторы метода анализировали эндогенные частицы в выдыхаемом воздухе и после экстракции и электрофоретического разделения детектировали 124 белка методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией. Последующая идентификация осуществляется методами протеомики. 83% идентифицированных белков имеют бронхоальвеолярное происхождение, остальные входят в состав защитной жидкости, смачивающей эпителий дыхательных путей [41]. Затем они сравнили два способа пробоподготовки (эндогенные частицы и конденсат выдыхаемого воздуха). Оказалось, что альбумин, входящий в состав сурфактанта, определяется только в эндогенных частицах, но не в конденсате выдыхаемого воздуха, тогда как детекция белка А сурфактанта была 100%-й в случае эндогенных частиц, а в конденсате выдыхаемого воздуха он определялся в 21% проб [42]. Сурфактантный белок А детектируется также при остром респираторном дистресс-синдроме [12].

Наряду с большими пептидами в выдыхаемом воздухе обнаруживаются олигопептиды, являющиеся продуктами жизнедеятельности клеток. Сообщается, что маркером воспалительного процесса при астме является глутатион [24]. Глутатион представляет собой трипептид  $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин. В работе М.У. Yeh и соавт. [43] исследовано соотношение восстановленного и окисленного глутатиона в конденсате выдыхаемого воздуха. Отношение восстановленный/окисленный глутатион является одним из важнейших параметров, который показывает уровень оксидативного стресса. В этой работе сообщается о том, что при обострении астмы

уровень восстановленного глутатиона в конденсате выдыхаемого воздуха снижается по сравнению с лицами, не страдающими астмой, и восстанавливается до нормы после соответствующего лечения. Авторы предполагают, что отношение восстановленный/окисленный глутатион может служить маркером легочного окислительного стресса.

В выдыхаемом воздухе встречаются также олигопептиды, являющиеся продуктами реакций, осуществляемых протеолитическими ферментами, секретиремыми клетками, находящимися в состоянии воспаления. В частности, в конденсате выдыхаемого воздуха больных ХОБЛ с эмфиземой были идентифицированы трипептиды пролил-глицил-пролин и N-альфа-пролил-глицил-пролин, являющиеся продуктами распада коллагена и нейтрофильных хемоаттрактантов. Но они не были обнаружены у астматических больных и практически здоровых лиц [44]. Авторы предположили, что эти олигопептиды могут способствовать воспалению дыхательных путей при хронических заболеваниях легких с нейтрофилизом, таких как ХОБЛ и муковисцидозе и могут быть маркерами этих заболеваний и свидетельствовать о переходе ХОБЛ в эмфизематозный вариант. Этот тест можно использовать для дифференциальной диагностики астмы и ХОБЛ, эмфизематозной от неэмфизематозной ХОБЛ, а также для доклинической диагностики фактора риска ХОБЛ у длительно курящих [44].

Развитие методов метаболомики позволило выявить наличие в выдыхаемом воздухе аминокислот. Идентификация аминокислот осуществляется методом ЯМР или хромасс-спектрометрией. Так, в конденсате выдыхаемого воздуха здоровых лиц обнаружены аминокислоты пролин и тирозин, а также их производные трансгидроксипролин и нитротирозин [45]. Показано, что у сварщиков их уровни повышены после 8-часовой работы [46]. Предполагается, что трансгидроксипролин может быть маркером фиброза легких, а нитротирозин – воспаления дыхательных путей [45]. В работе К. Syslova и соавт. [24] тирозин и нитротирозин рассматриваются как маркеры окислительного стресса.

Наряду с этим в конденсате выдыхаемого воздуха здоровых лиц обнаружены аминокислоты лизин [47] и глутамин [48]. Глутамин отсутствует в пробах больных с ХОБЛ.

Производное лизина карбоксиметиллизин может быть маркером оценки включения малых бронхов в астматический процесс. Показано, что уровень этого вещества в конденсате выдыхаемого воздуха астматических больных существенно ниже, чем у здоровых лиц, и что это связано с дисфункцией малых бронхов [49].

Таким образом, исследование наличия конкретных белков, пептидов и аминокислот может быть основой дифференциального диагноза бронхолегочных патологий и ранней диагностики злокачественных новообразований. Наряду с этим более широкое и прицельное использование методов протеомики и метаболомики может создать основу для ранней донозологической диагностики и выявления первичных факторов риска этих заболеваний, поскольку маломасштабные биохимические изменения, с которых начинается любой патологический процесс, могут быть своевременно детектированы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы (государственный контракт № 14.512.11.0021).*

#### Литература

1. Байкова Л.А., Федоров В.И. Разработка условий хроматографического разделения минерало-, глюкокортикоидов и андрогенов коры надпочечников с помощью хроматографа «Милихром» // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1993. Т. 79, № 3. С. 119–122.
2. Федоров В.И. Современное состояние проблемы анализа неорганических элементов в сыворотке крови // Клинич. лаб. диагностика. 2006. № 4. С. 8–14.
3. Fedorov V.I., Khamoyan A.G., Shevela E.Ya., Chernykh E.R. Investigation of possibility of submillimeter laser using as instrument for diagnostics in medicine // Proc. of the SPIE. 2007. V. 6734. P. 673404-1–673404-7.
4. Федоров В.И., Черкасова О.П. Разработка метода определения активности ренина плазмы крови с помощью нового флюоресцентного субстрата ренина // Клинич. лаб. диагностика. 2001. № 5. С. 33–35.
5. Курова В.С., Кононихин А.С., Сахаров Д.А., Попов И.А., Ларина И.М., Тоневицкий А.Г., Варфоломеев С.Д., Николаев Е.Н. Экзогенные белки в конденсате выдыхаемого воздуха // Биоорганическая химия. 2011. Т. 37, № 1. С. 55–60.
6. Chan H., Lewis C., Thomas P.S. Exhaled breath analysis: novel approach for early detection of lung cancer // Lung Cancer. 2009. V. 63, № 2. P. 164–168.
7. Борукаева И.Х. Зависимость изменений конденсата выдыхаемого воздуха от тяжести хронического обструктивного бронхита // Вестн. новых мед. технологий. 2007. Т. 14, № 3. С. 214–216.
8. Kullmann T., Barta I., Csiszer E., Antus B., Horváth I. Differential cytokine pattern in the exhaled breath of patients with lung cancer // Pathol. Oncol. Res. 2008. V. 14, № 4. P. 481–483.
9. Barta I., Kullmann T., Csiszer E., Antus B. Analysis of cytokine pattern in exhaled breath condensate of patients with squamous cell lung carcinoma // Int. J. Biol. Markers. 2010. V. 25, № 1. P. 52–56.
10. Bloemen K., Hooyberghs J., Desager K., Witters E., Schoeters G. Non-invasive biomarker sampling and analysis of the exhaled breath proteome // Proteomics Clin. Appl. 2009. V. 3, № 4. P. 498–504.
11. Gessner C., Dihazi H., Brettschneider S., Hammerschmidt S., Kuhn H., Eschrich K., Keller T., Engelmann L., Sack U., Wirtz H. Presence of cytokeratins in exhaled breath condensate of mechanical ventilated patients // Respir. Med. 2008.

- V. 102, № 2. P. 299–306.
12. Crader K.M., Repine J.J.D., Repine J.E. Breath Biomarkers and the Acute Respiratory Distress Syndrome // *J. Pulmonar Respirat. Med.* 2012. V. 2, № 1. P. 1000111-1–1000111-9.
  13. Fumagalli M., Ferrari F., Luisetti M., Stolk J., Hiemstra P.S., Capuano D., Viglio S., Fregonese L., Cerveri I., Corana F., Tinelli C., Iadarola P. Profiling the proteome of exhaled breath condensate in healthy smokers and COPD patients by LC-MS/MS // *J. Mol. Sci.* 2012. V. 13, № 11. P. 13894–13910.
  14. Дугарова И.Д. Диагностическая значимость цитокинового профиля конденсата выдыхаемого воздуха у пациентов с бронхиальной астмой: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 2010. 26 с.
  15. Robroeks C.M., van de Kant K.D., Jöbsis Q., Hendriks H.J., van Gent R., Wouters E.F., Damoiseaux J.G., Bast A., Wodzig W.K., Dompeling E. Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma // *Clin. Exp. Allergy.* 2007. V. 37, № 9. P. 1303–1311.
  16. Liang Y., Yeligar S.M., Brown L.A.S. Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease // *The Scientific World J.* 2012. V. 2012. Article ID 217518.
  17. Matsunaga K., Yanagisawa S., Ichikawa T., Ueshima K., Akamatsu K., Hirano T., Nakanishi M., Yamagata T., Minakata Y., Ichinose M. Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: correlation with physiologic properties in asthmatic patients // *J. Allergy and Clin. Immunol.* 2006. V. 118, № 1. P. 84–90.
  18. Robroeks C.M., Jöbsis Q., Damoiseaux J.G.M.C., Heijmans P.H.M., Rosias P.P.R., Hendriks H.J.E., Dompeling E. Cytokines in exhaled breath condensate of children with asthma and cystic fibrosis // *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 2006. V. 96, № 2. P. 349–355.
  19. Sack U., Scheibe R., Wötzel M., Hammerschmidt S., Kuhn H., Emmrich F., Hoheisel G., Wirtz H., Gessner C. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate // *Cytometry A.* 2006. V. 69, № 3. P. 169–172.
  20. Borrill Z.L., Roy K., Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD // *Eur. Respir. J.* 2008. V. 32, № 2. P. 472–486.
  21. Ko F.W.S., Lau C.Y.K., Leung T.F., Wong G.W.K., Lam C.W., Hui D.S. Exhaled breath condensate levels of 8-isoprostane, growth related oncogene alpha and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Respir. Med.* 2006. V. 100, № 4. P. 630–638.
  22. Ichikawa T., Matsunaga K., Minakata Y., Yanagisawa S., Ueshima K., Akamatsu K., Hirano T., Nakanishi M., Sugiura H., Yamagata T., Ichinose M. Possible impact of salivary influence on cytokine analysis in exhaled breath condensate // *Analyt. Chem. Insights.* 2007. № 2. P. 85–92.
  23. Keskin O., Keskin M., Kucukosmanoglu E., Ozkars M.Y., Gogebakan B., Kul S., Bayram H., Coskun Y. Exhaled RANTES and interleukin 4 levels after exercise challenge in children with asthma // *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 2012. V. 109, № 5. P. 303–308.
  24. Syslova K., Kačer P., Kuzma M., Novotny P., Pelcova D. Determination of Biomarkers in Exhaled Breath Condensate: A Perspective Way in Bronchial Asthma Diagnostics // *Bronchial Asthma – Emerging Therapeutic Strategies* / Ed. E. Sapey. InTech. Rijeka. Croatia. 2012. P. 37–74.
  25. Carpagnano G.E., Spanevello A., Curci C., Salerno F., Palladino G.P., Resta O., Di Gioia G., Carpagnano F., Foschino Barbaro M.P. IL-2, TNF-a, and leptin: local versus systemic concentrations in NSCLC patients // *Oncol. Res.* 2007. V. 16, № 8. P. 375–381.
  26. Davis M.D., Montpetit A., Hunt J. Exhaled breath condensate: an overview // *Immunol. and Allergy Clin. North Amer.* 2012. V. 32, № 3. P. 363–375.
  27. Ahmadzai H., Huang S., Hettiarachchi R., Lin J.L., Thomas P.S., Zhang Q. Exhaled breath condensate: a comprehensive update // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013. V. 51, № 7. P. 1343–1361.
  28. Rosias P.P., Robroeks C.M., Niemarkt H.J., Kester A.D., Vernooy J.H., Suykerbuyk J., Teunissen J., Heynens J., Hendriks H.J., Jöbsis Q., Dompeling E. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate // *Eur. Respir. J.* 2006. V. 28, № 5. P. 1036–1041.
  29. Horváth I., Lázár Z., Gyulai N., Kollai M., Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer // *Eur. Respir. J.* 2009. V. 34, № 1. P. 261–275.
  30. 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. Suppl. 1. P. 78–84.
  31. Nishioka T., Uchida K., Meno K., Ishii T., Aoki T., Imada Y., Makino Y., Hirata K., Matsumoto Y., Arinami T., Noguchi E. Alpha-1-antitrypsin and complement component C7 are involved in asthma exacerbation // *Proteomics Clin. Appl.* 2008. V. 2, № 1. P. 46–54.
  32. Plymoth A., Yang Z., Lofdahl C.G., Ekberg-Jansson A., Dahlback M., Fehniger T.E., Marko-Varga G., Hancock W.S. Rapid proteome analysis of bronchoalveolar lavage samples of lifelong smokers and never-smokers by micro-scale liquid chromatography and mass spectrometry // *Clin. Chem.* 2006. V. 52, № 4. P. 671–679.
  33. Zietkowski Z., Skiepkó R., Tomasiak M.M., Bodzenta-Lukaszyk A. Endothelin-1 in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients // *Respir. Med.* 2008. V. 102, № 3. P. 470–474.
  34. Zietkowski Z., Skiepkó R., Tomasiak M.M., Bodzenta-Lukaszyk A. Endothelin-1 in exhaled breath condensate of allergic asthma patients with exercise-induced bronchoconstriction // *Resp. Res.* 2007. № 8. P. 76.
  35. Carpagnano G.E., Spanevello A., Palladino G.P., Gramiccioni C., Ruggieri C., Carpagnano F., Foschino Barbaro M.P. Cigarette smoke and increased COX-2 and survivin levels in exhaled breath condensate of lung cancer patients: how hot is the link? // *Lung Cancer.* 2010. V. 67, № 1. P. 108–113.
  36. Gessner C., Rechner B., Hammerschmidt S., Kuhn H., Hoheisel G., Sack U., Ruschpler P., Wirtz H. Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer // *Lung Cancer.* 2010. V. 68, № 2. P. 177–184.
  37. Chang W.C., Huang M.S., Yang C.J., Wang W.Y., Lai T.C., Hsiao M., Chen C.H. Dermcidin identification from exhaled air for lung cancer diagnosis // *Europ. Respir. J.* 2010. V. 35, № 5. P. 1182–1185.
  38. Николаев Е.Н., Рябоконь А.М., Киреева Г.Х., Пикин О.В., Багров В.И., Кононихин А.С., Попов И.А., Ларина И.М., Варфоломеев С.Д. Метод диагностики заболеваний дыхательной системы на основе анализа состава протеома конденсата выдыхаемого воздуха // *Фундаментальные науки – медицине. Тезисы докладов на конференциях и семинарах, проведенных в рамках научных подпрограмм в 2012 году.* М. Фирма «Слово». 2012.
  39. Kordiak J., Szemraj J., Hamara K., Bialasiewicz P., Nowak D. Complete surgical resection of lung tumor decreases exhalation of mutated KRAS oncogene // *Respir. Med.* 2012. V. 106, № 9. P. 1293–1300.
  40. Johnson G.R., Morawska L. The mechanism of breath aerosol formation // *J. Aerosol Med. and Pulm. Drug Deliv.*

2009. V. 22, № 3. P. 229–237.
41. Bredberg A., Gobom J., Almstrand A.C., Larsson P., Blennow K., Olin A.C., Mirgorodskaya E. Exhaled endogenous particles contain lung proteins // *Clin. Chem.* 2012. V. 58, № 2. P. 431–440.
42. Larsson P., Mirgorodskaya E., Samuelsson L., Bake B., Almstrand A.C., Bredberg A., Olin A.C. Surfactant protein A and albumin in particles in exhaled air // *Respir. Med.* 2012. V. 106, № 2. P. 197–204.
43. Yeh M.Y., Burnham E.L., Moss M., Brown L.A.S. Non-invasive evaluation of pulmonary glutathione in the exhaled breath condensate of otherwise healthy alcoholics // *Respir. Med.* 2008. V. 102, № 2. P. 248–255.
44. O'Reilly P., Bailey W. Clinical use of exhaled biomarkers in COPD // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2007. V. 2, № 4. P. 403–408.
45. Conventz A., Musiol A., Brodowsky C., Müller-Lux A., Dewes P., Kraus T., Schettgen T. Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007. V. 860, № 1. P. 78–85.
46. Gube M., Ebel J., Brand P., Göen T., Holzinger K., Reisinger U., Kraus T. Biological effect markers in exhaled breath condensate and biomonitoring in welders: impact of smoking and protection equipment // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2010. V. 83, № 7. P. 803–811.
47. Schettgen T., Tings A., Brodowsky C., Müller-Lux A., Musiol A., Kraus T. Simultaneous determination of the advanced glycation end product N-(epsilon)-carboxymethyllysine and its precursor, lysine, in exhaled breath condensate using isotope-dilution-hydrophilic-interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 387, № 8. P. 2783–2791.
48. De Laurentiis G., Paris D., Melck D., Maniscalco M., Marsico S., Corso G., Motta A., Sofia M. Metabonomic analysis of exhaled breath condensate in adults by nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Europ. Resp. J.* 2008. V. 32, № 5. P. 1175–1183.
49. Tochino Y., Kanazawa H., Ichimaru Y., Asai K., Kyoh S., Hirata K. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, a major advanced glycation end product in exhaled breath condensate as a biomarker of small airway involvement in asthma // *J. Asthma.* 2007. V. 44, № 10. P. 861–866.

Поступила в редакцию 10.07.2013 г.

Утверждена к печати 09.10.2013 г.

Фёдоров В.И. (✉) – профессор, ООО «Специальные технологии» (г. Новосибирск).

Карапузиков А.А., ООО «Специальные технологии» (г. Новосибирск).

Старикова М.К., ООО «Специальные технологии» (г. Новосибирск).

✉ Фёдоров Вячеслав Иванович, тел.: 8 (383) 336-48-56, 8-952-936-4390; e-mail: vif41@mail.ru

## PROTEINS, PEPTIDES AND AMINO ACIDS AS MARKERS OF BRONCHOPULMONARY DISEASES

Fedorov V.I., Karapuzikov A.A., Starikova M.K.

*Special Technologies Ltd., Novosibirsk, Russian Federation*

### ABSTRACT

The article is a review of current literature on a content of proteins, peptides and amino acids in human exhaled breath. The results of proteomics and metabolomics applying for selective detection of individual proteins, peptides and amino acids are described. The study of exhaled breath condensate and exhaled endogenous particles contained lung proteins are considered. The peculiarities of protein, peptide and amino acid content in exhaled breath at various respiratory diseases are described. It is shown that the detectable substances may be specific markers of individual diseases.

**KEY WORDS:** proteomics, metabolomics, diagnostics, disease markers, bronchopulmonary diseases, proteins, peptides, amino acids.

*Bulletin of Siberian Medicine, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 167–174*

### References

1. Baykova L.A., Fedorov V.I. *Sechenov's Physiological Journal*, 1993, vol. 79, no. 3, pp. 119–122 (in Russian).
2. Fedorov V.I. *Clinical laboratory diagnostics*, 2006, no. 4, pp. 8–14 (in Russian).
3. Fedorov V.I., Khamoyan A.G., Shevela E.Ya., Chernykh E.R. Investigation of possibility of submillimeter laser using as

- instrument for diagnostics in medicine. *Proc. of the SPIE*, 2007. V. 6734. P. 673404-1–673404-7.
4. Fedorov V.I., Cherkasova O.P. *Clinical laboratory diagnostics*, 2001, no. 5, pp. 33–35 (in Russian).
  5. Kurova V.S., Kononikhin A.S., Sakharov D.A., Popov I.A., Larina I.M., Tonevitskiĭ A.G., Varfolomeev S.D., Nikolaev E.N. *The Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2011, vol. 37, no. 1, pp. 55–60 (in Russian).
  6. Chan H., Lewis C., Thomas P.S. Exhaled breath analysis: novel approach for early detection of lung cancer. *Lung Cancer*, 2009, vol. 63, no. 2, pp. 164–168.
  7. Borukaeva I.H. *Journal of New Medical Technologies*, 2007, vol. 14, no. 3, pp. 214–216 (in Russian).
  8. Kullmann T., Barta I., Csiszer E., Antus B., Horváth I. Differential cytokine pattern in the exhaled breath of patients with lung cancer. *Pathol. Oncol. Res.*, 2008, vol. 14, no. 4, pp. 481–483.
  9. Barta I., Kullmann T., Csiszer E., Antus B. Analysis of cytokine pattern in exhaled breath condensate of patients with squamous cell lung carcinoma. *Int. J. Biol. Markers*, 2010, vol. 25, no. 1, pp. 52–56.
  10. Bloemen K., Hooyberghs J., Desager K., Witters E., Schoeters G. Non-invasive biomarker sampling and analysis of the exhaled breath proteome. *Proteomics Clin. Appl.*, 2009, vol. 3, no. 4, pp. 498–504.
  11. Gessner C., Dihazi H., Brettschneider S., Hammerschmidt S., Kuhn H., Eschrich K., Keller T., Engelmann L., Sack U., Wirtz H. Presence of cytokeratins in exhaled breath condensate of mechanical ventilated patients. *Respir. Med.*, 2008, vol. 102, no. 2, pp. 299–306.
  12. Crader K.M., Repine J.J.D., Repine J.E. Breath Biomarkers and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *J. Pulmonar Respirat. Med.*, 2012, vol. 2, no. 1. P. 1000111-1–1000111-9.
  13. Fumagalli M., Ferrari F., Luisetti M., Stolk J., Hiemstra P.S., Capuano D., Viglio S., Fregonese L., Cerveri I., Corana F., Tinelli C., Iadarola P. Profiling the proteome of exhaled breath condensate in healthy smokers and COPD patients by LC-MS/MS. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, vol. 13, no. 11, pp. 13894–13910.
  14. Dugarova I.D. *The diagnostic value of cytokine pattern of exhaled breath condensate in asthma patients*. Author. dis. cand. med. sci. Moscow, 2010. 26 p. (in Russian).
  15. Robroeks C.M., van de Kant K.D., Jöbsis Q., Hendriks H.J., van Gent R., Wouters E.F., Damoiseaux J.G., Bast A., Wodzig W.K., Dompeling E. Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2007, vol. 37, no. 9, pp. 1303–1311.
  16. Liang Y., Yeligar S.M., Brown L.A.S. Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease. *The Scientific World J.*, 2012, vol. 2012. Article ID 217518.
  17. Matsunaga K., Yanagisawa S., Ichikawa T., Ueshima K., Akamatsu K., Hirano T., Nakanishi M., Yamagata T., Minakata Y., Ichinose M. Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: correlation with physiologic properties in asthmatic patients. *J. Allergy and Clin. Immunol.*, 2006, vol. 118, no. 1, pp. 84–90.
  18. Robroeks C.M., Jöbsis Q., Damoiseaux J.G.M.C., Heijmans P.H.M., Rosias P.P.R., Hendriks H.J.E., Dompeling E. Cytokines in exhaled breath condensate of children with asthma and cystic fibrosis. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, 2006, vol. 96, no. 2, pp. 349–355.
  19. Sack U., Scheibe R., Wötzel M., Hammerschmidt S., Kuhn H., Emmrich F., Hoheisel G., Wirtz H., Gessner C. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry A.*, 2006, vol. 69, no. 3, pp. 169–172.
  20. Borrill Z.L., Roy K., Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur. Respir. J.*, 2008, vol. 32, no. 2, pp. 472–486.
  21. Ko F.W.S., Lau C.Y.K., Leung T.F., Wong G.W.K., Lam C.W., Hui D.S. Exhaled breath condensate levels of 8-isoprostane, growth related oncogene alpha and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.*, 2006, vol. 100, no. 4, pp. 630–638.
  22. Ichikawa T., Matsunaga K., Minakata Y., Yanagisawa S., Ueshima K., Akamatsu K., Hirano T., Nakanishi M., Sugiura H., Yamagata T., Ichinose M. Possible impact of salivary influence on cytokine analysis in exhaled breath condensate. *Analyt. Chem. Insights.*, 2007, no. 2, pp. 85–92.
  23. Keskin O., Keskin M., Kucukosmanoglu E., Ozkars M.Y., Gogebakan B., Kul S., Bayram H., Coskun Y. Exhaled RANTES and interleukin 4 levels after exercise challenge in children with asthma. *Ann Allergy, Asthma Immunol.*, 2012, vol. 109, no. 5, pp. 303–308.
  24. Syslova K., Kačer P., Kuzma M., Novotny P., Pelcova D. Determination of Biomarkers in Exhaled Breath Condensate: A Perspective Way in Bronchial Asthma Diagnostics. *Bronchial Asthma – Emerging Therapeutic Strategies*. Ed. E. Sapey. InTech. Rijeka. Croatia. 2012, pp. 37–74.
  25. Carpagnano G.E., Spanevello A., Curci C., Salerno F., Palladino G.P., Resta O., Di Gioia G., Carpagnano F., Foschino Barbaro M.P. IL-2, TNF-a, and leptin: local versus systemic concentrations in NSCLC patients. *Oncol. Res.* 2007, vol. 16, no. 8, pp. 375–381.
  26. Davis M.D., Montpetit A., Hunt J. Exhaled breath condensate: an overview. *Immunol. and Allergy Clin. North Amer.*, 2012, vol. 32, no. 3, pp. 363–375.
  27. Ahmadzai H., Huang S., Hettiarachchi R., Lin J.L., Thomas P.S., Zhang Q. Exhaled breath condensate: a comprehensive update. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2013, vol. 51, no. 7, pp. 1343–1361.
  28. Rosias P.P., Robroeks C.M., Niemarkt H.J., Kester A.D., Vernooij J.H., Suykerbuyk J., Teunissen J., Heynens J., Hendriks H.J., Jöbsis Q., Dompeling E. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *Eur. Respir. J.*, 2006, vol. 28, no. 5, pp. 1036–1041.
  29. Horváth I., Lázár Z., Gyulai N., Kollai M., Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer. *Eur. Respir. J.*, 2009, vol. 34, no. 1, pp. 261–275.
  30. 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, suppl. 1, pp. 78–84.
  31. Nishioka T., Uchida K., Meno K., Ishii T., Aoki T., Imada Y., Makino Y., Hirata K., Matsumoto Y., Arinami T., Noguchi E. Alpha-1-antitrypsin and complement component C7 are involved in asthma exacerbation. *Proteomics Clin. Appl.*, 2008, vol. 2, no. 1, pp. 46–54.
  32. Plymoth A., Yang Z., Lofdahl C.G., Ekberg-Jansson A., Dahlback M., Fehniger T.E., Marko-Varga G., Hancock W.S. Rapid proteome analysis of bronchoalveolar lavage samples of lifelong smokers and never-smokers by micro-scale liquid chromatography and mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2006, vol. 52, no. 4, pp. 671–679.
  33. Zietkowski Z., Skiepkó R., Tomasiak M.M., Bodzenta-Lukaszyk A. Endothelin-1 in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients. *Respir. Med.*, 2008, vol. 102, no. 3, pp. 470–474.
  34. Zietkowski Z., Skiepkó R., Tomasiak M.M., Bodzenta-Lukaszyk A. Endothelin-1 in exhaled breath condensate of allergic asthma patients with exercise-induced bronchocon-

- striction. *Resp. Res.*, 2007, no. 8, pp. 76.
35. Carpagnano, G.E., Spanevello A., Palladino G.P., Gramiccioni C., Ruggieri C., Carpagnano F., Foschino Barbaro M.P. Cigarette smoke and increased COX-2 and survivin levels in exhaled breath condensate of lung cancer patients: how hot is the link? *Lung Cancer.*, 2010, vol. 67, no. 1, pp. 108–113.
  36. Gessner C., Rechner B., Hammerschmidt S., Kuhn H., Hoheisel G., Sack U., Ruschpler P., Wirtz H. Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.*, 2010, vol. 68, no. 2, pp. 177–184.
  37. Chang W.C., Huang M.S., Yang C.J., Wang W.Y., Lai T.C., Hsiao M., Chen C.H. Dermcidin identification from exhaled air for lung cancer diagnosis. *Europ. Respir. J.*, 2010, vol. 35, no. 5, pp. 1182–1185.
  38. Nikolaev E.N., Ryabokon A.M., Kireeva G.Kh., Pikin O.V., Bagrov V.I., Kononikhin A.S., Popov I.A., Larina I.M., Varfolomeev S.D. *The diagnostic method of respiratory diseases by analyzing of proteome composition of exhaled breath condensate*. Fundamental Sciences to Medicine. Abstracts of papers at conferences and seminars held in the framework of scientific subprograms in 2012. Moscow, Slovo, 2012. (in Russian).
  39. Kordiak J., Szemraj J., Hamara K., Bialasiewicz P., Nowak D. Complete surgical resection of lung tumor decreases exhalation of mutated KRAS oncogene. *Respir. Med.*, 2012, vol. 106, no. 9, pp. 1293–1300.
  40. Johnson G.R., Morawska L. The mechanism of breath aerosol formation. *J. Aerosol Med. and Pulm. Drug Deliv.*, 2009, vol. 22, no. 3, pp. 229–237.
  41. Bredberg A., Gobom J., Almstrand A.C., Larsson P., Blennow K., Olin A.C., Mirgorodskaya E. Exhaled endogenous particles contain lung proteins. *Clin. Chem.*, 2012, vol. 58, no. 2, pp. 431–440.
  42. Larsson P., Mirgorodskaya E., Samuelsson L., Bake B., Almstrand A.C., Bredberg A., Olin A.C. Surfactant protein A and albumin in particles in exhaled air. *Respir. Med.*, 2012, vol. 106, no. 2, pp. 197–204.
  43. Yeh M.Y., Burnham E.L., Moss M., Brown L.A.S. Non-invasive evaluation of pulmonary glutathione in the exhaled breath condensate of otherwise healthy alcoholics. *Respir. Med.*, 2008, vol. 102, no. 2, pp. 248–255.
  44. O'Reilly P., Bailey W. Clinical use of exhaled biomarkers in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2007, vol. 2, no. 4, pp. 403–408.
  45. Conventz A., Musiol A., Brodowsky C., Müller-Lux A., Dewes P., Kraus T., Schettgen T. Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, vol. 860, no. 1, pp. 78–85.
  46. Gube M., Ebel J., Brand P., Göen T., Holzinger K., Reisinger U., Kraus T. Biological effect markers in exhaled breath condensate and biomonitoring in welders: impact of smoking and protection equipment. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 2010, vol. 83, no. 7, pp. 803–811.
  47. Schettgen T., Tings A., Brodowsky C., Müller-Lux A., Musiol A., Kraus T. Simultaneous determination of the advanced glycation end product N-(epsilon)-carboxymethyllysine and its precursor, lysine, in exhaled breath condensate using isotope-dilution-hydrophilic-interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, vol. 387, no. 8, pp. 2783–2791.
  48. De Laurentiis G., Paris D., Melck D., Maniscalco M., Marsico S., Corso G., Motta A., Sofia M. Metabonomic analysis of exhaled breath condensate in adults by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Europ. Resp. J.*, 2008, vol. 32, no. 5, pp. 1175–1183.
  49. Tochino Y., Kanazawa H., Ichimaru Y., Asai K., Kyoh S., Hirata K. N-(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, a major advanced glycation end product in exhaled breath condensate as a biomarker of small airway involvement in asthma. *J. Asthma*, 2007, vol. 44, no. 10, pp. 861–866.

**Fyodorov V.I.** (✉), Special Technologies Ltd., Novosibirsk, Russian Federation.

**Karapuzikov A.A.**, Special Technologies, Novosibirsk Ltd., Russian Federation.

**Starikova M.K.**, Special Technologies, Novosibirsk Ltd., Russian Federation.

✉ **Fyodorov Vyacheslav I.**, Ph. +7 (383) 336-48-56, +7-952-936-4390; e-mail: vif41@mail.ru