

А.М.Рябоконт<sup>1</sup>, Э.Х.Анаев<sup>2</sup>, А.С.Кононихин<sup>1,3</sup>, Н.Л.Стародубцева<sup>1,4</sup>, Г.Х.Киреева<sup>1</sup>, И.А.Попов<sup>1,3</sup>, Е.Н.Кукаев<sup>1</sup>, В.В.Бармин<sup>5</sup>, В.А.Багров<sup>5</sup>, О.В.Пикин<sup>5</sup>, Е.Н.Николаев<sup>1,3</sup>, С.Д.Варфоломеев<sup>1</sup>

## Сравнительный протеомный анализ конденсата выдыхаемого воздуха у пациентов с раком легкого методом масс-спектрометрии высокого разрешения

1 – ФГБУ "Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля" РАН: 119991, Москва, ул. Косыгина, 4;

2 – ФБГУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России: 105077, Россия, Москва, ул. 11-я Парковая, 32, корп. 4;

3 – ФГБУ "Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л.Тальрозе" РАН: 119334, Москва, Ленинский пр-т, 38, корп. 2;

4 – ФГБУ "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова" Минздрава России: 117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4;

5 – ФГБУ "Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена" Минздрава России: 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., 3

*A.M.Ryabokon', E.Kh.Anaev, A.S.Kononikhin, N.L.Starodubtseva, G.Kh.Kireeva, I.A.Popov, E.N.Kukaev, V.V.Barmin, V.A.Bagrov, O.V.Pikin, E.N.Nikolaev, S.D.Varfolomeev*

## Comparative proteomic analysis of exhaled breath condensate in patients with lung carcinoma using high resolution mass-spectrometry

### Summary

Analysis of exhaled breath condensate (EBC) is a promising non-invasive method to diagnose respiratory diseases. Most researchers emphasize the importance of proteomic analysis of EBC for early diagnosis of certain respiratory diseases including lung cancer. This study was aimed at identification of potential biomarkers of neoplastic disorders in EBC of patients with lung cancer using high-performance liquid chromatography and high resolution mass-spectrometry. The study involved 26 patients with lung carcinoma (21 males, 5 females, mean age  $57 \pm 12$  years) and 23 healthy non-smokers (19 males, 4 females, mean age  $30 \pm 7$  years). EBC samples were collected using a disposable portable condenser R-Tube.

The most of proteins identified (65 %) belonged to keratin family including type 1 (1; 2; 5 and 6A) and type 2 (9; 10; 14; 16 and 17) cytoskeletal keratins and transport proteins (albumin, lipocalin-1). Keratin family proteins (5, 6 and 14) prevailed in lung cancer patients compared to controls ( $p < 0.05$ ). Other 6 proteins were also detected predominantly in lung cancer patients including  $\beta$ -subunit and  $\alpha$ -subunit of haemoglobin, nuclear ubiquitous casein (NUCKS), high-mobility group proteins (HMG-I/HMG-Y), and lactoferrin. Most of these proteins could be used as a diagnostic panel to detect lung cancer. Further investigations are needed to estimate diagnostic values of these biomarkers and their role in pathogenesis of lung cancer.

**Key words:** lung cancer, diagnosis, exhaled breath condensate, proteomic analysis, high-performance liquid chromatography and high resolution mass-spectrometry.

### Резюме

Анализ конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) является перспективным неинвазивным методом оценки состояния дыхательной системы. Многие исследователи указывают на важность анализа протеома КВВ для раннего выявления заболеваний респираторного тракта, в т. ч. диагностики рака легкого (РЛ). В исследовании, в которое были включены 2 группы доноров: основная – больные РЛ ( $n = 26$ ; 21 мужчина, 5 женщин; средний возраст –  $56,5 \pm 11,5$  года) и контрольная ( $n = 23$ ; 19 мужчин, 4 женщины; средний возраст –  $30,0 \pm 7,0$  года) – здоровые некурящие добровольцы, у больных РЛ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии была проведена идентификация потенциальных белков-онкомаркеров в КВВ. Образцы КВВ были собраны с помощью одноразового портативного конденсора R-Tube.

Основную часть (65 %) идентифицированных белков составили белки кератиновой группы, в т. ч. кератины цитоскелетные 1-го (1, 2, 5 и 6А) и 2-го (9, 10, 14, 16 и 17) типов, а также группа транспортных белков (альбумин, липокалин-1). Было показано, что группа кератинов (5, 6 и 14) более значительно выражена ( $p < 0,05$ ) у онкологических больных по сравнению со здоровым контролем. Также 6 белков были преимущественно определены в КВВ доноров основной группы, в т. ч.  $\beta$ - и  $\alpha$ -субъединицы гемоглобина, ядерный убиквитин-казеин (NUCKS), белки группы высокой подвижности (HMG-I/HMG-Y), лактоферрин. Большинство выявленных белков может быть предложено в качестве панели для диагностики РЛ. Однако необходимы дальнейшие исследования для определения диагностической значимости предложенных биомаркеров и их роли в патогенезе РЛ.

**Ключевые слова:** рак легкого, диагностика, конденсат выдыхаемого воздуха, протеомный анализ, хромато-масс-спектрометрия.

Наиболее важной функцией дыхательной системы является жизнеобеспечение, ее состояние отражает образ жизни человека и его здоровье. Анализ выдыхаемого воздуха в качестве простого неинвазивного метода для диагностики заболеваний нижних отделов дыхательных путей с недавних пор вызывает большой

интерес [1–3]. Конденсат выдыхаемого воздуха (КВВ) собирается с помощью специальных стандартных устройств и может быть проанализирован с помощью различных химических, иммунохимических, метаболомных и протеомных методов. Важной задачей анализа КВВ является раннее выявление патологических

изменений в респираторной системе. Бронхиальный секрет дистальных отделов дыхательных путей содержит ряд нелетучих и > 200 летучих соединений, большинство из которых относится к биомаркерам болезней органов дыхания [4, 5]. В основном поиск биомаркеров воспаления ведется среди липидов — метаболитов арахидоновой кислоты (простагландины, лейкотриены, изопростаны и др.) [6] и белков — цитокинов (интерлейкины, фактор некроза опухоли- $\alpha$  и др.) [7]. К пневмоопухолевым маркерам относятся также различные маркеры ангиогенеза (ангиогенин), концентрация которых значительно повышается у больных с III–IV стадией рака [8].

Кератины являются основными цитоскелетными белками в КВВ и некоторые из них уже используются для медицинской диагностики рака легкого (РЛ) [9, 10]. Так, тест-система CYFRA 21-1 применяется в клинической практике для измерения уровня фрагмента кератина-19, который экспрессируется опухолевыми клетками в кровь. Данный подход используется для мониторинга и оценки ответа на терапевтические вмешательства, в частности в случае плоскоклеточного РЛ [9]. Показано, что кератин-19 присутствует в плевральной жидкости больных РЛ [10]. Одновременное определение 2 различных опухолевых маркеров — CYFRA 21-1 и карциноэмбрионального антигена, локализованного в мембранах эпителиальных клеток, увеличивает точность диагностики [11]. Кроме того, было показано, что кальций-связывающий белок S100A7 может быть использован в качестве потенциального маркера некоторых форм РЛ, таких как крупноклеточная карцинома [12].

Очевидно, что число различных биомаркеров болезней органов дыхания, идентифицированных в КВВ, будет увеличиваться в ходе дальнейших исследований.

Мощный инструмент протеомики — высокоэффективная жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС / МС) остается в настоящее время самым эффективным методом для наиболее полного описания белкового состава биологических жидкостей, в т. ч. КВВ. Преимущество этого метода состоит в быстрой идентификации широкого спектра белков в смеси. Кроме того, применение ВЭЖХ-МС / МС позволяет расширить динамический диапазон и повысить селективность масс-спектрометрического анализа, использование которого, в свою очередь, позволяет получать данные о белках, концентрация которых в смеси отличается на несколько порядков. При работе с КВВ данное методологическое преимущество представляется критичным, поскольку нанограммовые концентрации потенциальных белков-маркеров в образце КВВ определяются *in situ* на фоне основных цитоскелетных белков и сложной низкомолекулярной матрицы неизвестного состава.

В предыдущих исследованиях анализировались показатели КВВ у молодых здоровых некурящих доноров методом ВЭЖХ-МС / МС [13, 14]. Проведено сравнение различных способов концентрирования белка с целью оптимизации подготовки КВВ к про-

теомному анализу [13]. В результате была разработана новая потенциальная платформа для биомедицинской диагностики, основанная на протеомном анализе неинвазивно получаемого КВВ человека [13, 14]. Платформа была использована для мониторинга изменения протеомного состава КВВ пациента после 1-й в России успешной билатеральной трансплантации легких в 2006 г. [15]. Также впервые было показано, что экзогенные и эндогенные белки могут быть дифференцированы в выдыхаемом воздухе человека [16].

В данном исследовании использована ранее разработанная методологическая платформа для анализа КВВ с целью выявления белков-онкомаркеров в образцах, полученных у больных РЛ.

Целью исследования была идентификация потенциальных белков-онкомаркеров в КВВ у больных РЛ методом ВЭЖХ-МС / МС.

## Материалы и методы

### Доноры КВВ

Были обследованы 2 группы доноров: больные с диагностированным РЛ ( $n = 26$ ; 21 мужчина, 5 женщин; средний возраст —  $56,5 \pm 11,5$  года), находящиеся на лечении в 1-м хирургическом торакальном отделении МНИОИ им. П.А.Герцена (основная группа) и здоровые некурящие добровольцы — контрольная группа ( $n = 23$ ; 19 мужчин, 4 женщины; средний возраст —  $30,0 \pm 7,0$  года) (табл. 1).

### Сбор КВВ

Образцы КВВ были собраны в 1-й половине дня после тщательного ополаскивания полости рта дистиллированной водой. Особое внимание уделялось исключению носового дыхания (с помощью носового зажима) и белкового загрязнения КВВ слюной и слизистой носоглотки. Для исключения загрязнения образца КВВ слюной определялось присутствие в спектрах белка  $\alpha$ -амилазы — специфического белка слюны.

КВВ собирались в течение 10 мин с использованием предварительно охлажденной до  $-20^\circ\text{C}$  R-Tube (Respiratory Research, США). Собранные пробы помещались в полипропиленовые пробирки, замораживались и хранились в морозильнике при  $-85^\circ\text{C}$  до проведения анализа в соответствии с ранее опубликованным протоколом [13].

### Подготовка образцов для масс-спектрометрического анализа

Аликвота КВВ (объем  $\approx 1$  мл) переносилась в полипропиленовые пробирки с низкой белок-абсорбирующей поверхностью, устойчивые к низким температурам, и лиофилизировались в тех же пробирках до полного высыхания. Затем образцы КВВ подвергались гидролизу модифицированным трипсином (Promega, США), добавленным в соотношении фермент / белок — 1 : 100 (по массе) в 0,05М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  буфер (pH 8,0) при  $30^\circ\text{C}$ . Реакция останавливалась после 20 ч инкубации добавлением 2 мкл 1%-ного

**Таблица 1**  
**Клиническая характеристика пациентов**  
**обследованных групп**

Показатель	Основная группа, n = 26	Контрольная группа, n = 23
Пол, мужчины / женщины	21 / 5	19 / 4
Возраст, годы	56,5 ± 11,5	30,0 ± 7,0
Статус курения, n (%):		
курящие	14 (54)	–
некурящие	12 (46)	23 (100)
Гистологический тип, n (%):		
плоскоклеточная карцинома	11 (42)	–
аденокарцинома	4 (15)	–
ангиокарцинома	1 (4)	–
рак матки с метастазами в легкие	1 (4)	–
другие виды рака	9 (35)	–
Стадия, n (%):		
0	–	–
1	1 (4)	–
2	8 (31)	–
3	12 (46)	–
4	5 (19)	–
T-дескриптор, n (%):		
0	0	–
1	7 (27)	–
2	14 (54)	–
3	3 (11)	–
4	2 (8)	–
N-дескриптор, n (%):		
0	1 (4)	–
1	10 (38)	–
2	14 (54)	–
3	1 (4)	–
4	0	–
M-дескриптор, n (%):		
0	21 (81)	–
1	5 (19)	–
2	0	–
3	0	–
4	0	–

раствора муравьиной кислоты [13]. Полученный раствор анализировался с помощью нанопоточной ВЭЖХ-МС / МС.

### ВЭЖХ-МС / МС

Эксперименты ВЭЖХ-МС / МС проводились на системе, состоящей из хроматографа *Agilent 1100* (*Agilent Technologies Inc.*, Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра *LTQ-FT Ultra* (*Thermo*, Бремен, Германия) — масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса (ИЦР), совмещенный с линейной квадрупольной ионной ловушкой, использующейся для накопления ионов и измерения спектров столкновительно-индуцированной фрагментации (CID) (МС / МС) ионов. Объем вводимой на колонку пробы составлял 1 мкл, использовалась колонка 75 мкм × 12 см с фазой *Reprosil-Pur Basic* C18, 3 мкм (*Dr. Maisch HPLC GmbH*, Аммербух-Энтринген, Германия), изготовленная в лаборатории по

методике Манна и др. [17]. В качестве подвижной фазы использовались: растворитель А: 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в H<sub>2</sub>O-HCOOH (1 000 : 1 по объему); растворитель В: 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты в CH<sub>3</sub>CN-HCOOH (1 000 : 1 по объему). Проводилась градиентная хроматография с линейным увеличением относительного содержания растворителя В в потоке 3–50 % 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<sup>6</sup>). На 2-й стадии из ИЦР масс-спектра выбирались 3 максимальных пика, для которых производилась CID.

### Биоинформационный анализ данных

Список точных масс пептидов и их фрагментов использовался для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы *Mascot* (*Matrix Science*, Лондон, Великобритания; версия 2.0.04). Для идентификации белков использовалась база данных *IPI-human* (версия 3.82; выпуск 06.04.11; 92 104 записи), предоставляемая Европейским институтом биоинформатики. 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 > 2 пептидов (рейтинг > 24). Автоматическая фильтрация и валидация списка белков и пептидов осуществлялась с использованием программы *Scaffold 4.0* (версия *Scaffold-01\_07\_00*, *Proteome Software Inc.*, Портленд, Орегон, США). Также считалось, что пептид идентифицирован верно, если вероятность его определения была > 95,0 % согласно алгоритму *Peptide Prophet*. Считается, что для надежной идентификации белков вероятность их определения должна быть > 99,0 % согласно алгоритму *Peptide Prophet* [18].

### Результаты и обсуждение

Белковый профиль образцов КВВ определялся у 2 групп доноров. Клинические характеристики обследованных групп представлены в табл. 1. Средний возраст больных составил 56,5 года (45–68 лет), 80,8 % из них были мужского пола, 54 % — курильщики. Наиболее частым гистологическим типом рака был плоскоклеточный (42 %). Большинство пациентов имели сопутствующие заболевания: артериальная гипертензия, болезни желудочно-кишечного тракта и др.

При помощи протеомного анализа КВВ у онкологических больных (n = 26) и здоровых доноров (n = 23) выявлено > 40 различных белков. Основные 19 белков представлены в табл. 2. Критерии идентификации белков были следующие: вероятность —

99,9 %, рейтинг пептида > 24, ложные идентификации – 0,87 %. Считалось, что пептид идентифицирован верно, если вероятность его определения была > 95,0 % согласно алгоритму *Peptide Prophet* [18].

Как и ожидалось, основные группы идентифицированных белков (65 %) представляли кератины, в т. ч. цитоскелетные кератины 1-го типа (1, 2, 5, 6A), цитоскелетные 2-го типа (9, 10, 14, 16, 17), и группа транспортных белков: альбумин, липокалин-1. Эти т. н. основные белки составляют 80–90 % общего количества белка КВВ, что согласуется с результатами предыдущих исследований [13]. Наиболее часто встречающимися белками во всех образцах были цитокератины 1-го и 2-го типов (1, 2, 5, 6, 9, 10, 14). Согласно каталогу белков человека, цитокератины 1, 2, 9, 10 имеют эпидермальное происхождение, поэтому считается, что данные белки либо вносятся при пробоподготовке, либо имеют экзогенное происхождение, т. е. не относятся к белкам дыхательных путей [19]. В предыдущем исследовании [13, 16] выдвинуто предположение, что эти экзогенные кератины в КВВ являются свободно циркулирующими белками воздуха и должны быть исключены из дальнейшего анализа протеома КВВ.

Обнаружено достоверное различие ( $p < 0,05$ ) содержания кератинов 5, 6, 14, имеющих эндогенное происхождение, в КВВ контрольной группы и группы с онкопатологией (рис. 1). Уровень этих кератинов значительно выше в группе больных РЛ по сравнению со здоровым контролем. Методом ELISA ранее были получены данные о высокой распростра-

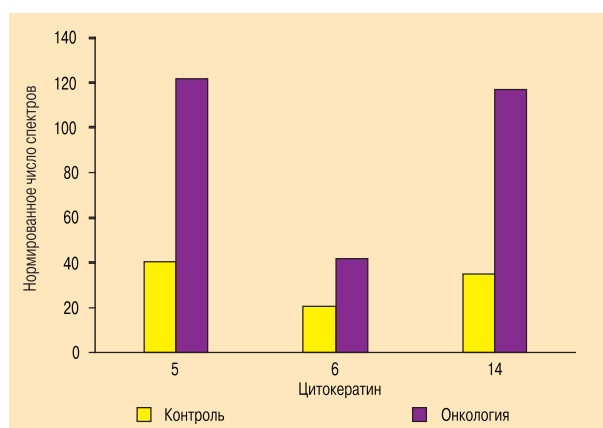


Рис. 1. Сравнение уровня содержания цитокератинов 5, 6, 14 в КВВ между контрольной и основной (онкологической) группами

ненности цитокератина 6 при плоскоклеточном раке ( $p < 0,001$ ) и аденокарциноме ( $p = 0,004$ ) по сравнению с бронхиальным эпителием [20].

Таким образом, цитокератины 5, 6 и 14 могут быть предложены в качестве панели для диагностики РЛ, но должны быть проведены дальнейшие исследования для определения их диагностического значения и роли в патогенезе РЛ.

Для определения различий в экспрессии белков был проведен *Q-Q Scatter plot*-анализ выделенных групп. Оказалось, что белки, отличающие здоровый контроль от онкологической группы, принадлежат к основным белкам: кератин 1-го типа (1, 9, 10), кератин 2-го типа цитоскелетный эпидермальный

Таблица 2  
Основные белки, идентифицированные в КВВ

Идентифицированные белки	ИПИ номер	Молекулярный вес, кДа	Контрольная группа, n = 23	Основная группа, n = 26
Цитоскелетные кератины 2-го типа (1)	IPI00220327	66	19	26
Цитоскелетные кератины 2-го типа (2) эпидермальные	IPI00021304	66	9	26
Цитоскелетные кератины 2-го типа (5)	IPI00009867	62	8	19
Цитоскелетные кератины 2-го типа (6A)	IPI00300725 (+2)	60	3	6
Цитоскелетные кератины 1-го типа (9)	IPI00019359	62	20	25
Цитоскелетные кератины 1-го типа (10)	IPI00009865	59	17	26
Цитоскелетные кератины 1-го типа (14)	IPI00384444	52	8	20
Дермцидин	IPI00027547	11	11	22
Изоформа 1 $\alpha_1$ -антитрипсина	IPI00553177	47	2	9
Простагландин-H2D-изомеразы	IPI00013179 (+1)	21	11	3
Липокалин-1	IPI00009650	19	4	10
цДНК FLJ78440, сходная с человеческим Lf	IPI00298860 (+2)	78	–	10
Гемоглобин $\beta$ -субъединица	IPI00654755	16	–	5
Протеин 16 кДа	IPI00790327	16	–	11
Изоформа ядерного убиквитинового казеина (NUCKS)	IPI00022145 (+1)	27	–	9
Гемоглобин $\alpha$ -субъединица	IPI00410714	15	–	3
Изоформа HMG-I – белка группы высокой мобильности HMG-I / HMG-Y	IPI00179700 (+2)	12	–	5
СОР9 сигналосома	IPI00171844	46	5	–
Изоформа 1 сывороточного альбумина	IPI00745872	69	17	26

Примечание: Lf – лактоферрин; цДНК – циклическая ДНК.





Рис. 2. Белки, обнаруженные в образцах КВВ онкологических больных

имеют экзогенное происхождение и составляют основной пул белков КВВ, маскируя таким образом относительно низкое содержание других белков.

Среди белков некератиновой природы, которые были достоверно идентифицированы у 30 % здоровых доноров, следует отметить: простагландин- $H2D$ -изомеразу – медиатор аллергических и воспалительных процессов, который опосредует хемотаксис эозинофилов и базофилов в тканях легких [21], а также кининоген – ингибитор тиюловых протеаз, играющих важную роль в свертывании крови. В 20 % образцов КВВ здоровых доноров были определены пептиды, характерные для белка  $COP9$  сигнасомы (CSN). Ранее у млекопитающих было 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 [22]. Низкий уровень этого белка в КВВ у онкологических больных может быть связан с дисфункцией убиквитиновой защиты в раковых клетках.

Некоторые белки были найдены только у отдельных доноров, например изоформа  $\alpha$ -цепи фибриногена, цистатин-А и т. д. Эти белки являются нормальными участниками обмена веществ, и изменения в их экспрессии могут быть связаны с другими неопухолевыми заболеваниями [15].

В образцах КВВ онкологической группы обнаружено 6 белков:  $\beta$ - и  $\alpha$ -субъединицы гемоглобина, изоформы ядерного убиквитинового казеина (NUCKS), изоформы HMG-I – белка группы высокой мобильности HMG-I/HMG-Y и цДНК FLJ78440, сходная с человеческим Lf (рис. 2).

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 аденин-тимин-богатых последовательностях индивидуальных генов. В исследованиях на мышах было показано, что сверхэкспрессия клетками HMG-I/Y белков приводит к онкологической трансформации [23]. Однако молекулярные механизмы, которые обеспечивают сверхэкспрессию белка в раковых клетках, по-прежнему неясны [24].

Известно, что уровень Lf повышается в несколько раз при различных воспалительных заболеваниях. Увеличение содержания Lf было обнаружено у пациентов, имеющих хронические гиперплазии, рак различной локализации и лимфопролиферативные заболевания. Так, например, у женщин была продемонстрирована сверхэкспрессия белка Lf и матричной РНК в злокачественной аденокарциноме эндометрия по сравнению с нормальными эпителиальными клетками [25]. Таким образом, потенциал оценки уровня Lf в качестве маркера опухоли достаточно убедителен.

Среди белков, обнаруживаемых в КВВ у онкологических больных, идентифицирован NUCKS (рис. 3). NUCKS является ядерным ДНК-связывающим белком, который широко экспрессируется и имеет высокие уровни в щитовидной железе, предстательной железе и матке, печени плода, тимусе и легких.

В настоящее время биологическая функция NUCKS плохо изучена. Однако распространение NUCKS в быстро растущих 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.* проанализировали экспрессию NUCKS в клетках карциномы молочной железы и обнаружили ее высокий уровень при различных поражениях, в т. ч. базальном и плоскоклеточном раке. Авторы предположили, что NUCKS можно использовать в качестве нового потенциального биомаркера злокачественности опухоли [26].

В КВВ у больных ( $n = 8$ ) был идентифицирован белок гемоглобин. Сравнение клинических характеристик этих пациентов показало более тяжелое течение онкологического заболевания по сравнению с другими больными. Также у этих пациентов можно предположить наличие легочного кровотечения.

Выявленные белки были аннотированы согласно имеющейся информации из базы данных геномной онтологии. В результате поиска были выделены биологические процессы с разницей по уровню белков между 2 группами доноров  $> 15\%$ . Продemonстрировано, что в онкологической группе преобладают гены метаболических путей, связанных с процессами, имеющими преимущественное распространение в быстро растущих злокачественных клетках, а именно – направленным движением белка, вовлеченного в транспорт молекул (метаболиты, белок и т. д.), ионов или электронов через клеточные мембраны, внутри клетки или в тканевых жидкостях. Примером такого белка является железосвязывающий гликопротеин Lf. Также у больных онкологической группы выявлено больше белков, принимающих участие в биологических процессах, связанных с ростом клеток, регуляцией клеточного цикла и гибелью клеток. Это относится к белкам, регулирующим экспрессию генов и индуцибельную транскрипцию, в частности HMG-I из группы высокой мобильности HMG-I/HMG-Y и, возможно, NUCKS. Значимых различий в локализации клеточного компонента между

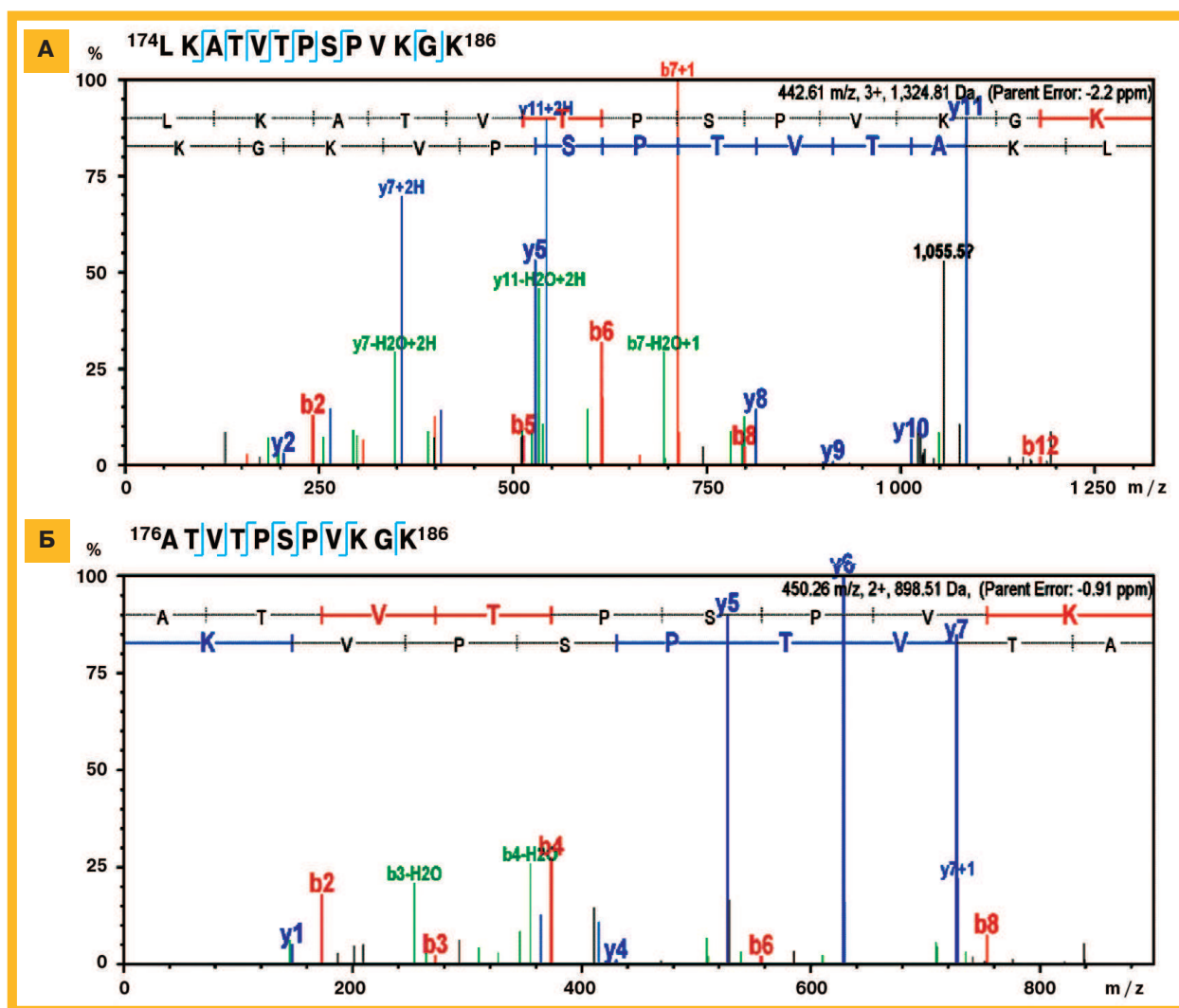


Рис. 3. MS / MS 2 уникальных пептидов NUCKS, IPI00022145  
Примечание: по оси ординат – относительная интенсивность.

2 группами доноров не обнаружено. Среди онтологических категорий "молекулярные функции" в группе онкологических больных значимо преобладает такая категория, как функция белков-переносчиков, тогда как каталитическая и молекулярная активность трансдукторов наиболее выражена у больных контрольной группы.

## Заключение

В настоящем исследовании были использованы ранее разработанные подходы для идентификации белков в КВВ у пациентов с РЛ [13, 14]. Показано, что группа кератинов 5, 6 и 14 значительно более выражена при онкопатологии по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Выделена группа из 6 белков, преимущественно детектируемых в КВВ у больных РЛ, а именно –  $\beta$ - и  $\alpha$ -субъединицы гемоглобина, изоформы NUCKS, HMG-I белка группы высокой мобильности HMG-I/HMG-Y и цДНК FLJ78440, сходная с человеческим Lf. Большинство выявленных белков может быть предложено в качестве панели для диагностики РЛ, но необходимо

проведение дальнейших исследований с целью определения их диагностической значимости и роли в патогенезе развития РЛ.

Таким образом, анализ КВВ представляется перспективным неинвазивным методом диагностики болезней респираторного тракта. Кроме того, важным шагом является разработка платформы для количественного анализа потенциальных биомаркеров в КВВ для оценки эффективности проводимого медикаментозного лечения, химиотерапии и хирургического вмешательства [15].

## Благодарность

Авторы выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований за поддержку работы (12-08-33089-мол-а-вед, 13-08-01445-а, 14-08-01236-а, 14-08-31360 мол-а, 14-08-31652-мол-а, 13-04-40110-Н-КОМФИ).

## Литература

1. Kuban P., Foret F. Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. *Analyt. Chim. Acta* 2013; 805: 1–18.

2. Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Исследование конденсата выдыхаемого воздуха в пульмонологии (обзор). Пульмонология 2002; 2: 57–66.
3. Hunt J. Exhaled breath condensate: an overview. Immunol. Allergy Clin. N. Am. 2007; 27: 587–596.
4. Scheideler L., Manke H.-G., Schwulera U. et al. Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool? Am. Rev. Respir. Dis. 1993; 148 (3): 778–784.
5. Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Конденсат выдыхаемого воздуха в диагностике и оценке эффективности лечения болезней органов дыхания. Пульмонология 2006; 4: 12–20.
6. Moloney E., Mumby S., Gajdosci R. et al. Exhaled breath condensate detects markers of pulmonary inflammation after cardiothoracic surgery. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004; 169: 64–69.
7. Shahid S., Kharitonov S., Wilson N. et al. Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002; 165: 1290–1293.
8. Gessner C., Rechner B., Hammerschmidt S. et al. Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2010; 68 (2): 177–184.
9. Barak V., Goike H., Panaretakis K., Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. Clin. Biochem. 2004; 37: 529–540.
10. Lai R.-S., Chen C.-C., Lee P.-C., Lu J.-Y. Evaluation of cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) as a tumor marker in malignant pleural effusion. Jpn J. Clin. Oncol. 1999; 29 (9): 421–424.
11. Paganuzzi M., Onetto M., Marroni P. et al. Diagnostic value of CYFRA 21-1 tumor marker and CEA in pleural effusion due to mesothelioma. Chest 2001; 119: 1138–1142.
12. Zhang H., Zhao Q., Chen Y. et al. Selective expression of S100A7 in lung squamous cell carcinomas and large cell carcinomas but not in adenocarcinomas and small cell carcinomas. Thorax 2008; 63: 352–359.
13. Kurova V., Anaev E., Kononikhin A. et al. Proteomics of exhaled breath: methodological nuances and pitfalls. Clin. Chem. Lab. Med. 2009; 47: 706–712.
14. Kurova V., Kurochkin I., Kalamkarov G. et al. Structural and catalytic polymorphism of human enzymes: Novel potential platforms for biomedical diagnostics. Biotechnol. Adv. 2009; 27 (6): 945–959.
15. Курова В., Кононихин А., Попов И. и др. Масс-спектрометрический мониторинг белкового состава конденсата выдыхаемого воздуха больного, перенесшего трансплантацию легких. Изв. РАН. Сер. хим. 2010; 59 (1): 292–296.
16. Курова В., Кононихин А., Попов И. и др. Экзогенные белки в конденсате выдыхаемого человеком воздуха. Био-орган. химия 2011; 37 (1): 55–60.
17. 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.
18. Nesvizhskii A., Keller A., Kolker E., Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Analyt. Chem. 2003; 75 (17): 4646–4658.
19. Hoffmann H., Tabaksblat L., Enghild J., Dahl R. Human skin keratins are the major proteins in exhaled breath condensate. Eur. Respir. J. 2008; 31: 380–384.
20. 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.
21. 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: 3703–3708.
22. Wei N., Deng X.W. The COP9 signalosome. Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 2003; 19: 261–286.
23. Wood L., Maher J., Bunton T., Resar L. The oncogenic properties of the HMG-I gene family. Cancer Res. 2000; 60: 4256–4261.
24. Resar L. The high mobility group A1 gene: transforming inflammatory signals into cancer? Cancer Res. 2010; 70: 436–439.
25. Walmer D., Padin C., Wrona M. et al. Malignant transformation of the human endometrium is associated with overexpression of lactoferrin messenger RNA and protein. Cancer Res. 1995; 55: 1168–1175.
26. Ziolkowski P., Wozniak M., Dus K., Wisniewski J. The NUCKS: A novel tumor biomarker. J. Mol. Biomark. Diagn. 2013; 4: 3.

## Информация об авторах

Рябokonь Анна Монолитовна – к. х. н., ст. научный сотрудник ИБХФ РАН; тел.: (495) 939-71-40; e-mail: amryabokon@gmail.com  
 Анаев Эльдар Хусеевич – д. м. н., зав. лабораторией неинвазивных методов диагностики клинического отдела ФГБУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России; тел.: (495) 465-53-84; e-mail: el\_anaev@hotmail.com  
 Кононихин Алексей Сергеевич – к. ф.-м. н., ст. научный сотрудник ИНЭПХФ РАН, научный сотрудник ИБХФ РАН; тел.: (495) 939-73-70; e-mail: konoleha@yandex.ru  
 Стародубцева Наталия Леонидовна – к. б. н., зав. лабораторией протеомики репродукции человека ФГБУ "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова" Минздрава России, научный сотрудник ИБХФ РАН; тел.: (495) 939-73-70; e-mail: aurgum19@mail.ru  
 Киреева Гузель Хасановна – аспирант ИБХФ РАН; тел.: (495) 939-71-40; e-mail: nicheshnaya@yandex.ru  
 Попов Игорь Алексеевич – к. ф.-м. н., ст. научный сотрудник ИБХФ РАН, ст. научный сотрудник ИНЭПХФ РАН; тел.: (495) 939-73-70; e-mail: hexapole@gmail.com  
 Кукаев Евгений Николаевич – научный сотрудник ИБХФ РАН; тел.: (495) 939-73-70; e-mail: kukaev@mail.ru  
 Бармин Виталий Валерьевич – мл. научный сотрудник 1-го хирургического торакального отделения МНИОИ им. П.А.Герцена; тел.: (495) 945-41-20; e-mail: vitality.barmin@gmail.com  
 Багров Владимир Алексеевич – врач-хирург 1-го хирургического торакального отделения МНИОИ им. П.А.Герцена; тел.: (495) 945-41-20; e-mail: vbagrov76@mail.ru  
 Пикин Олег Валентинович – д. м. н., руководитель 1-го хирургического торакального отделения МНИОИ им. П.А.Герцена; тел.: (495) 945-41-20; e-mail: pikin\_ov@mail.ru  
 Николаев Евгений Николаевич – д. ф.-м. н., профессор, зав. лабораторией ИНЭПХФ РАН, зав. лабораторией ИБХФ РАН; тел.: (495) 939-73-70; e-mail: ennikolaev@rambler.ru  
 Варфоломеев Сергей Дмитриевич – член-кор. РАН, профессор, директор ИБХФ РАН; тел.: (499) 137-64-20; e-mail: sdvarf@sky.chph.ras.ru

Поступила 31.01.14  
 © Коллектив авторов, 2014  
 УДК 616.24-006.6-074