

УДК 616.24 543.64  
©Коллектив авторов

## ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА В ЦЕЛЯХ ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

**А.С. Кононихин<sup>1,2\*</sup>, К.Ю. Федорченко<sup>2,3</sup>, А.М. Рябоконь<sup>2,3</sup>,  
Н.Л. Стародубцева<sup>1,2</sup>, И.А. Попов<sup>1,2</sup>, М.Г. Завьялова<sup>1</sup>, Э.Х. Анаев<sup>4</sup>,  
А.Г. Чучалин<sup>4</sup>, С.Д. Варфоломеев<sup>2,3</sup>, Е.Н. Николаев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова,  
117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4; эл. почта: alex.kononikhin@gmail.com

<sup>2</sup>Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН,  
119934, Москва, ул. Косыгина, 4

<sup>3</sup>Химический факультет Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ул. Ленинские горы, 1

<sup>4</sup>Научно-исследовательский институт пульмонологии,  
105077, Москва, ул. 11-я Парковая, 32, корп. 4

Исследование протеомного состава конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ), представляется перспективным неинвазивным методом диагностики болезней респираторного тракта человека. В рамках данного исследования проанализирован протеомный состав КВВ 53 доноров, включая пациентов с различными заболеваниями дыхательной системы. Инвариантными для всех проб являлись цитоскелетные кератины II типа (1, 2, 3, 4, 5, 6) и цитоскелетные кератины I типа (9, 10, 14, 15, 16). Анализируя частоту встречаемости белков в разных группах можно выделить несколько категорий белков: обнаруженные у всех (дермцидин, альфа-1-микроглобулина, SHROOM3), в двух группах одновременно (CSTA, LCN1, JUP, PIP, TXN) и специфичные для одной группы (PRDX1, Аннексин A1/A2). С использованием ВЭЖХ-МС/МС можно идентифицировать потенциальные белки-маркеры, характерные для воспаления лёгких инфекционного (пневмония) и неинфекционного генеза (хроническая обструктивная болезнь лёгких, ХОБЛ).

**Ключевые слова:** конденсат выдыхаемого воздуха, масс-спектрометрия, протеомика, ХОБЛ, пневмония

**DOI:** 10.18097/PBMC20156106777

### ВВЕДЕНИЕ

Анализ конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ), как простой неинвазивный метод, всё чаще используется для исследования и диагностики патологий дыхательной системы [1, 2]. Он может служить альтернативой традиционного эндоскопического обследования нижних отделов дыхательных путей. Будучи неинвазивной, процедура по сбору КВВ может быть осуществлена даже для пациентов с тяжёлым течением болезни [3]. Развитие и применение протеомных технологий для изучения белков в конденсатах выдыхаемого воздуха человека представляется перспективным и достаточно новым направлением [4, 5]. Наиболее информативным методом для протеомного анализа является высокоэффективная жидкостная хроматография, совмещённая с тандемной масс-спектрометрией

(ВЭЖХ-МС/МС). Этот метод позволяет расширить динамический диапазон, повысить селективность анализа и обнаружить белки, концентрация которых в смеси отличается на несколько порядков. При работе с КВВ данное методологическое преимущество представляется критичным, поскольку нанограммовые количества потенциальных белков-маркеров в образце КВВ определяются *in situ* на фоне основных цитоскелетных белков и сложной низкомолекулярной матрицы неизвестного состава [5, 6]. Наибольший интерес представляет исследование протеома КВВ с целью диагностики состояния дыхательной системы в норме и при патологии [7-9]. Нами было проведено исследование протеомного состава КВВ пациентов с различными патологиями респираторной системы (ХОБЛ, пневмония) с целью определения характерного профиля белков и выявления потенциальных белков-маркеров.

\* - адресат для переписки

## МЕТОДИКА

Образцы КВВ (53 образца) были собраны у следующих групп пациентов: 17 больных хронической обструктивной болезнью лёгких (ХОБЛ) в стадии обострения (пациенты пульмонологического отделения ГKB № 57), 13 больных с внебольничной пневмонией (пациенты пульмонологического отделения ГKB № 57), а также 23 здоровых некурящих донора. От каждого участника исследования было получено информированное согласие. Основные характеристики групп доноров приведены в таблице 1 (более подробно в Приложении 1).

Таблица 1. Демографические и клинические данные групп пациентов, включённых в исследование.

Характеристика	Группа обследуемых		
	ХОБЛ	пневмония	контроль
Количество, n	17	13	23
Возраст, лет	64,7±4,7	36,2±12,2	27,5±4,8
Мужчины, n (%)	13 (76)	7 (54)	10 (43)
Женщины, n (%)	4 (24)	6 (46)	13 (57)
Курение, активное/ранее / никогда	5/12/02	2/4/07	0/0/23
Тяжесть заболевания	0/3/10/4*	2/4/2/3/2**	***

Примечание: \* - степень тяжести по рекомендации “Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики ХОБЛ”: I/II/III/IV, обострение 2 или 3 типа по критерию Anthonisen; \*\* - индекс тяжести пневмонии: I/II/III/IV/V; \*\*\* - отсутствие аллергии, хронических/острых заболеваний дыхательной системы в течение двух месяцев до забора образца КВВ.

Конденсат выдыхаемого воздуха собирали с помощью специальной стандартизованной аппаратуры EcoScreen и Rtube (“Respiratory Research, Inc.”, США) в соответствии с протоколом, описанным ранее [6, 8]. Образцы КВВ собирали в течение 10 мин в первой половине дня после тщательного ополаскивания полости рта дистиллированной водой. Аликвоту КВВ (~объём 1 мл) переносили в полипропиленовые пробирки, устойчивые к низким температурам, с низкой белок-абсорбирующей поверхностью, лиофилизировали до полного высыхания и хранили при -85°C до проведения анализа. Образцы КВВ подвергали гидролизу модифицированным трипсином (“Promega”, США), с последующим ВЭЖХ-МС/МС анализом [6]. Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов использовался для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы Mascot по базе данных IPI-human [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Протеомный анализ КВВ пациентов с лёгочными заболеваниями и здоровых лиц контрольной группы позволил идентифицировать общие и специфичные белки. Во всех группах с различной частотой

встречаемости присутствовали цитоскелетные кератины II типа (1, 2, 3, 4, 5, 6) и цитоскелетные кератины I типа (9, 10, 14, 15, 16). Примерно с одинаковой частотой во всех рассматриваемых группах доноров были идентифицированы такие белки, как иммуноглобулин альфа, кинниноген, сывороточный альбумин, цинк-альфа2-гликопротеин, лизоцим.

На рисунке представлены данные по частоте идентификации в пробах тех белков, которые были идентифицированы как в контрольной группе, так и в фокусных группах по рассматриваемым заболеваниям, но частота встречаемости этих белков в пробах здорового контроля отличалась от групп больных ХОБЛ и пневмонией. Среди белков с наибольшей частотой встречаемости в пробах характеризовался дермцидин (DCD) – белок-антибиотик, обладающий антибактериальной и протеолитической активностями. В случае с группами здорового контроля и ХОБЛ дермцидин являлся практически инвариантным (частота встречаемости в пробах 96%, 94% соответственно). Для группы больных пневмонией встречаемость этого белка падала до 60% (рисунок). Можно предположить, что нарушение в его секреции, и, как следствие, ослабление антибактериальной защиты организма, являлось одной из причин развития пневмонии. Помимо дермцидина, интересно отметить резкое снижение числа идентификаций предшественника альфа-1-микроглобулина/бикунина с более 80% идентификаций этого белка в пробах группы здорового контроля до порядка 10% идентификаций в пробах групп больных ХОБЛ и пневмонией

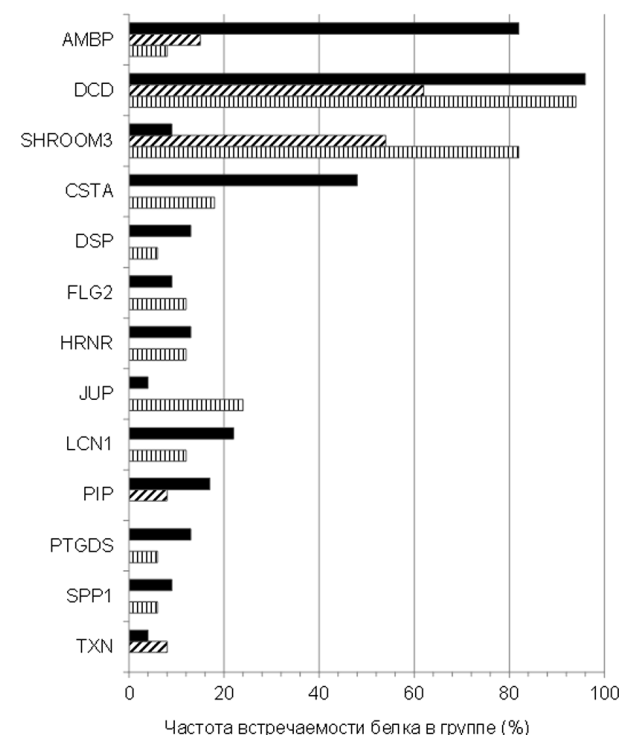


Рисунок. Оценка частоты встречаемости белков в пробах КВВ здорового контроля, пациентов с ХОБЛ и пневмонией. Чёрный цвет - контроль, косая линия - пневмония, прямая линия - ХОБЛ.

Таблица 2. Белки, идентифицированные только в протеоме КВВ больных ХОБЛ.

№	Ген	Название белка/ диагноз ХОБЛ
1.	CD3EAP	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA34
2.	EIF2S1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
3.	GPR179	G protein-coupled receptor 179
4.	HTRA2	Serine protease HTRA2, mitochondrial, Isoform 1
5.	LACRT	Extracellular glycoprotein lacritin
6.	NOC4L	Nucleolar complex protein 4 homolog
7.	NT5C1B	Cytosolic 5'-nucleotidase 1B, Isoform 2
8.	PDE8B	High affinity cAMP-specific and IBMX-insensitive 3',5'-cyclic phosphodiesterase 8B, Isoform 3
9.	PRDX1	Peroxiredoxin-1
10.	TFAP2D	Transcription factor AP-2 delta
11.	TLE2	Transducin-like enhancer protein 2
12.	UBA6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6, Isoform 1
13.	ZMYND8	Protein kinase C-binding protein 1, Isoform 8

Примечание. Здесь и в таблице 3 названия белков приведены в том виде, в котором они фигурируют в базе данных IPI-human.

Таблица 3. Белки, идентифицированные только в протеоме КВВ больных пневмонией.

№	Ген	Название белка
1.	ANXA1	Annexin A1
2.	ANXA2	Annexin A2
3.	BAG6	Isoform 2 of Large proline-rich protein BAT3
4.	CRNN	Cornulin
5.	CST6	Cystatin-M
6.	CSTB	Cystatin-B
7.	EGFR	Isoform 1 of Epidermal growth factor receptor
8.	_*	Histone H2B
9.	HSP90B1	Heat shock protein HSP 90-beta
10.	KMT2D	MLL2 564 kDa protein
11.	LAMA1	Laminin subunit alpha-1
12.	_**	LOC100129958 similar to hCG1643231
13.	_**	LOC100292594;LOC100288670;LOC100290955 hypothetical protein XP_002342097
14.	PDE4D	Isoform 6 of cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D
15.	PRSS3	Protease serine 4 isoform B
16.	SMCHD1	Isoform 1 of Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein
17.	SPRR3	Small proline-rich protein 3
18.	ZG16B	Zymogen granule protein 16 homolog B

Примечание: \* - Идентифицированы фрагменты белков семейства гистонов H2B; \*\* - гипотетические белки на основании данных секвенирования генома человека

(рисунок). Показано, что альфа-1-микроглобулин ингибирует иммунные функции лейкоцитов *in vitro* и его распределение связывают с защитной и противовоспалительной ролью *in vivo* [10], а репрессия бикунина характерна для воспаления [11]. Эти данные позволяют предположить, что острое воспаление, сопровождающее как ХОБЛ, так и пневмонию, может вызывать снижение уровня экспрессии предшественника альфа-1-микроглобулина/бикунина. Уменьшение количества белка, в свою очередь, должно приводить к затруднению его идентификации в пробах КВВ. Для белка SHROOM3 наблюдается обратная динамика, характеризующаяся резким возрастанием количества идентификаций в пробах больных пневмонией и ХОБЛ по сравнению со здоровыми лицами группы контроля, что объясняется деструкцией ткани респираторного тракта при данных патологиях [9]. В контрольной группе и группе больных ХОБЛ были

идентифицированы 8 белков, которые отсутствовали в пробах группы больных пневмонией, в то же время 2 белка, напротив, были идентифицированы только в контрольной группе и в группе больных пневмонией, но не были обнаружены ни в одной пробе из группы больных ХОБЛ.

В таблице 2 приведён список белков, идентифицированных только в пробах группы с диагнозом ХОБЛ, и отсутствовавших в протеомах КВВ здорового контроля и группы с диагнозом пневмония. Интересно отметить наличие в КВВ пероксиредоксина (PRDX) вместо тиоредоксина (TRX) у лиц контрольной группы и больных пневмонией. Известно, что белок тиоредоксин вырабатывается в ответ на присутствие внутриклеточного NO и участвует в регуляции апоптоза [12]. В свою очередь, пероксиредоксин вырабатывается в ответ на активные формы кислорода и окислительный стресс [13], что имеет место при ХОБЛ [14].

В таблице 3 приведен список белков, идентифицированных только в пробах группы больных пневмонией, и отсутствовавших в протеомах КВВ здорового контроля и группы больных ХОБЛ. Для КВВ больных пневмонией было характерно наличие аннексина A1/A2 (ANXA1/ ANXA2) и HSP90B – белков, принимающих участие в процессах воспаления в организме. Появление аннексина A2 и HSP90B1 в КВВ больных пневмонией может свидетельствовать о клеточном ответе на развивающуюся гипоксию, что подтверждает клиническую картину заболевания [15].

Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку работы Министерству образования и науки Российской Федерации (соглашение №14.613.21.0025, # RFMEFI61314X0025). Для анализа проб было использовано оборудование ЦКП ИБХФ РАН “Новые материалы и технологии”.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Scheidler L., Manke H.G., Schwulera U. Inacker O., Hammerle H. (1993) Am. Rev. Respir. Dis., **148**(3), 778-784.
2. Anaev E., Apyari V., Paganova E., Borisova A., Dmitrienko S., Karyakina E., Vagin M., Zolotov Yu., Chuchalin A., Karyakin A. (2010) Am. J. Biomed. Sci., **2**(4), 365-372.
3. Курова В.С., Анаев Э.Х., Кононихин А.С., Попов И.А., Федорченко К.Ю., Николаев Е.Н., Варфоломеев С.Д., Чучалин А.Г. (2010) Известия РАН, сер.хим., №1, 284-288.
4. Fumagalli M., Dolcini L., Sala A., Stolk J., Fregonese L., Ferrari F., Viglio S., Luisetti M., Iadarola P. (2008) J. Proteomics, **71**, 211-221.
5. Kurova V.S., Anaev E.C., Kononikhin A.S., Fedorchenko K.Y., Popov I.A., Kalupov T.L., Bratanov D.O., Nikolaev E.N., Varfolomeev S.D. (2009) Clin. Chem. Lab. Med., **47**, 706-712.
6. Курова В.С., Кононихин А.С., Попов И.А., Тоневский А.Г., Сахаров Д.А., Ларина И.М., Варфоломеев С.Д., Николаев Е.Н. (2011) Биоорганическая химия, **37**, 48-52.
7. Wiktorowicz J.E., Jamaluddin M. (2014) Adv. Exp. Med. Biol., **795**, 221-232.
8. Рябokonь А.М., Кононихин А.С., Анаев Э.Х., Стародубцева Н.Л., Киреева Г.Х., Попов И.А., Багров В.А., Николаев Е.Н., Варфоломеев С.Д. (2014) Пульмонология, №1, 5-11.
9. Анаев Э.Х., Кушаева М.Э., Курова В.С., Рябokonь А.М., Анохина Т.Н., Николаев Е.Н., Варфоломеев С.Д., Чучалин А.Г. (2012) Пульмонология, № 5, 5-9.
10. Urade Y., Hayaishi O. (2000) Vitam. Horm., **58**, 89-120.
11. Mizon C., Piva F., Queyrel V., Balduyck M., Hachulla E., Mizon J. (2002) Clin. Chem. Lab. Med., **40**, 579-586.
12. Sengupta R., Holmgren A. (2012) Biochim. Biophys. Acta, **1820**, 689-700.
13. Cox A.G., Winterbourn C.C., Hampton M.B. (2009) Biochem. J., **425**, 313-325.
14. Pichavant M., Rémy G., Bekaert S., Le Rouzic O., Kervoeze G., Vilain E., Just N., Tillie-Leblond I., Trottein F., Cataldo D., Gosset P. (2014) Mucosal Immunol., **7**, 568-578.
15. Chao J., Wood J.G., Gonzalez N.C. (2011) Respir. Physiol. Neurobiol. **178**, 439-448.
16. Vang A.G., Ben-Sasson S.Z., Dong H., Kream B., DeNinno M.P., Claffey M.M., Housley W., Clark R.B., Epstein P.M., Brocke S. (2010) PLoS One, **5**, e12011.
17. Liang Y., Yeligar S.M., Brown L.A. (2012) Scientific World J., 217518.

Поступила: 01. 10. 2015.

## PROTEOMIC ANALYSIS OF EXHALED BREATH CONDENSATE FOR DIAGNOSIS OF PATHOLOGIES OF THE RESPIRATORY SYSTEM

A.S. Kononikhin<sup>1,2</sup>, K.Yu. Fedorchenko<sup>2,3</sup>, A.M. Ryabokon<sup>2,3</sup>, N.L. Starodubtseva<sup>1,2</sup>, I.A. Popov<sup>1,2</sup>, M.G. Zavialova<sup>1</sup>, E.C. Anaev<sup>4</sup>, A.G. Chuchalin<sup>4</sup>, S.D. Varfolomeev<sup>2</sup>, E.N. Nikolaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,

4 Oparina str., Moscow, 117997 Russia; e-mail: alex.kononikhin@gmail.com

<sup>2</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, 4 Kosygina str., Moscow, 119334 Russia

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 1-3 Leninskie gory, Moscow, 119991 Russia

<sup>4</sup>Research Institute of Pulmonology, 32/61 11th Parkovaya str., Moscow, 105077 Russia

Study of the proteomic composition of exhaled breath condensate (EBC), is a promising non-invasive method for the diagnosis of the respiratory tract diseases in patients. In this study the EBC proteomic composition of the 79 donors, including patients with different pathologies of the respiratory system has been investigated. Cytoskeletal keratins type II (1, 2, 3, 4, 5, 6) and cytoskeletal keratins the type I (9, 10, 14, 15, 16) were invariant for all samples. Analyzing the frequency of occurrence of proteins in different groups of examined patients, several categories of protein have been recognized: found in all pathologies (Dermcidin, Alpha-1-microglobulin, SHROOM3), found in several pathologies (CSTA, LCN1, JUP, PIP, TXN), and specific for a single pathology (PRDX1, Annexin A1/A2). The EBC analysis by HPLC-MS/MS can be used to identify potential protein markers characteristic for pathologies such as chronic obstructive pulmonary disease (PRDX1) and pneumonia (Annexin A1/A2).

**Key words:** exhaled breath condensate, mass spectrometry, proteomics, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), pneumonia