Многокомпонентный диодный лазерный спектроанализатор для скрининговой диагностики содержания биомаркеров в выдыхаемых компонентах воздуха

А.А. Карабиненко1, С.Ю.Солтис1, Г.И.Сторожаков1, Ю.М.Петренко1, А.И.Надеждинский2, Я.Я.Понуровский2, М.В.Спиридонов2, В.Я.Заславский2

1 РНИМУ им. Пирогова, г. Москва, ул. Островитянова, 1. karabinenkoa@mail.ru,

2 ИОФ РАН им. Прохорова, г. Москва, Вавилова, 38. ponur1960@yandex.ru

Молекулярный состав выдыхаемого воздуха человека

В настоящее время, несмотря на интенсивные исследования, закономерности влияния метаболитов на организм и их регулирующая роль для большинства биологически активных молекул недостаточно хорошо изучены.

Помимо основных атмосферных молекул (H_2O, CO_2, N_2, O_2) в выдыхаемом воздухе (ВВ) человека выявлено более 1000 различных химических соединений с концентрациями на уровне ppb–ppt. Образование этих соединений тесно связано с метаболическими процессами в организме.

Связь концентрации молекулярного компонента в ВВ у человека с конкретной патологией установлена лишь для нескольких десятков молекул.

Например: 1) повышение концентрации окиси азота (NO) в ВВ, участвующего в «оксидативном стрессе», наиболее часто ассоциируется с бронхиальной астмой или другими заболеваниями легких, а также с артериальной гипертонией.

2) Увеличение концентрации выдыхаемого ацетона ($OC(CH_3)_2$) может свидетельствовать о наличии у пациента кетоацидоза на фоне сахарного диабета в фазе декомпенсации.

3) Аномально высокая концентрация выдыхаемого аммиака (NH_3) может служить индикатором декомпенсированной азотемической фазы хронической почечной недостаточности или заболеваний кишечника.

4) Для оценки функционального состояния хорошо известна диагностическая значимость отношения изотопов $^{13}C/^{12}C$ в выдыхаемой двуокиси углерода (CO_2), которая ассоциируется с деятельностью бактерий *Helicobacter pyroli* в слизистой оболочке желудка.

Диагностика заболеваний

Таблица выдыхаемых газовых компонент (фрагмент по MCM)

1. Terence Risby, Johns Hopkins University. From F.Tittel presentation at A.M.Prokhorov TDLS seminar # 9.

BROADBAND ABSORBERS

Compound	Concentration	Physiological basis/Pathology Indication
Acetaldehyde	ppb	Ethanol metabolism
Acetone	ppm	Decarboxylation of acetoacetate, diabetes
Ammonia	ppb	protein metabolism, liver and renal disease
Carbon dioxide	%	Product of respiration, Heliobacter pylori
Carbon disulfide	ppb	Gut bacteria, schizophrenia
Carbon monoxide	ppm	Production catalyzed by *heme oxygenase*
Carbonyl sulfide	ppb	Gut bacteria, liver disease
Ethane	ppb	Lipid peroxidation and oxidative stress
Ethanol	ppb	Gut bacteria
Ethylene	ppb	Lipid peroxidation, oxidative stress, cancer
Hydrocarbons	ppb	Lipid peroxidation/metabolism
Hydrogen	ppm	Gut bacteria
Isoprene	ppb	Cholesterol biosynthesis
Methane	ppm	Gut bacteria
Methanethiol	ppb	Methionine metabolism
Methanol	ppb	Metabolism of fruit
Methylamine	ppb	Protein metabolism
Nitric oxide	ppb	Production catalyzed by *nitric oxide synthase*
Oxygen	%	Required for normal respiration
Pentane	ppb	Lipid peroxidation, oxidative stress
Water	%	Product of respiration

Измерение концентрации выдыхаемых газов с использованием методов диодной лазерной спектроскопии (ДЛС)

Идея измерять концентрацию различных молекул в выдохе человека с помощью ДЛС имеет достаточно длительную историю. Нами предложен этот подход и начаты работы в данном направлении более 20 лет назад [2-4].
Принцип определения концентрации химических веществ в ВВ сводится к измерению прямого поглощения излучения диодного лазера химической молекулой. Для этих целей определяются аналитические линии спектра поглощения молекул.
В настоящее время имеются два направления применения ДЛС с использованием средне-энергетических и низко-энергетических систем диодного лазера инфракрасного диапазона, которые применялись для идентификации химических веществ в газообразных средах.

2. A.I.Kuznetzov, K.L.Moskalenko, A.I.Nadezhdinskii and E.V.Stepanov, Sensor Based on Tunable Diode Lasers and Mid-IR-Fiber Optic and Their Diagnostic Applications in Medicine and Enviromental Protection, Journal de Physique IV, 1, C7-253 (1991)
3. K.L.Moskalenko, N.Ya.Sobolev, I.A.Adamovskay, E.V.Stepanov, A.I.Nadezhdinskii, Susan McKenna-Lawlor, Tunable diode lasers application for fully automated absolute measurements of CO and CO2 concentrations in human breath, Proc.SPIE, 2205, 440-447 (1994)
4. K.L.Moskalenko, A.I.Nadezhdinskii, E.V.Stepanov, Tunable diode laser spectroscopy application for ammonia and methane content measurements in human breath, Proc.SPIE, 2205, 448-452 (1994)
5 Е.В.Степанов «Диодная лазерная спектроскопия и анализ молекул-биомаркеров» М., ФИЗМАТЛИТ», 2009..

Скрининговая диагностика содержания биомаркеров в выдыхаемом воздухе

- Проведение скрининговых дыхательных тестов является эффективным методом оценки функционального состояния организма. Под скрининговым исследованием в медицине понимают комплекс мер, направленных на выявление факторов риска заболевания или скрыто протекающей болезни в широкой группе населения при отсутствии ярко выраженных симптомов. Основными требованиями к скрининговым тестам является простота, неинвазивность и безопасность процедуры тестирования, высокая скорость обработки данных, возможность выявления заболеваний на ранней стадии.

- ***<u>Цель работы: выявить закономерности в изменении концентрации молекул ВВ и установить их связь с различными заболеваниями.</u>***

Для решения этой задачи было создано два варианта ДЛ-спектрометра инфракрасного диапазона:

1. **Диодный лазерный спектрометр для скрининговой диагностики выделяемых газовых компонент NH3 и H2O, содержащихся в испарениях пота с поверхности кожи ладоней (2009-2010).**

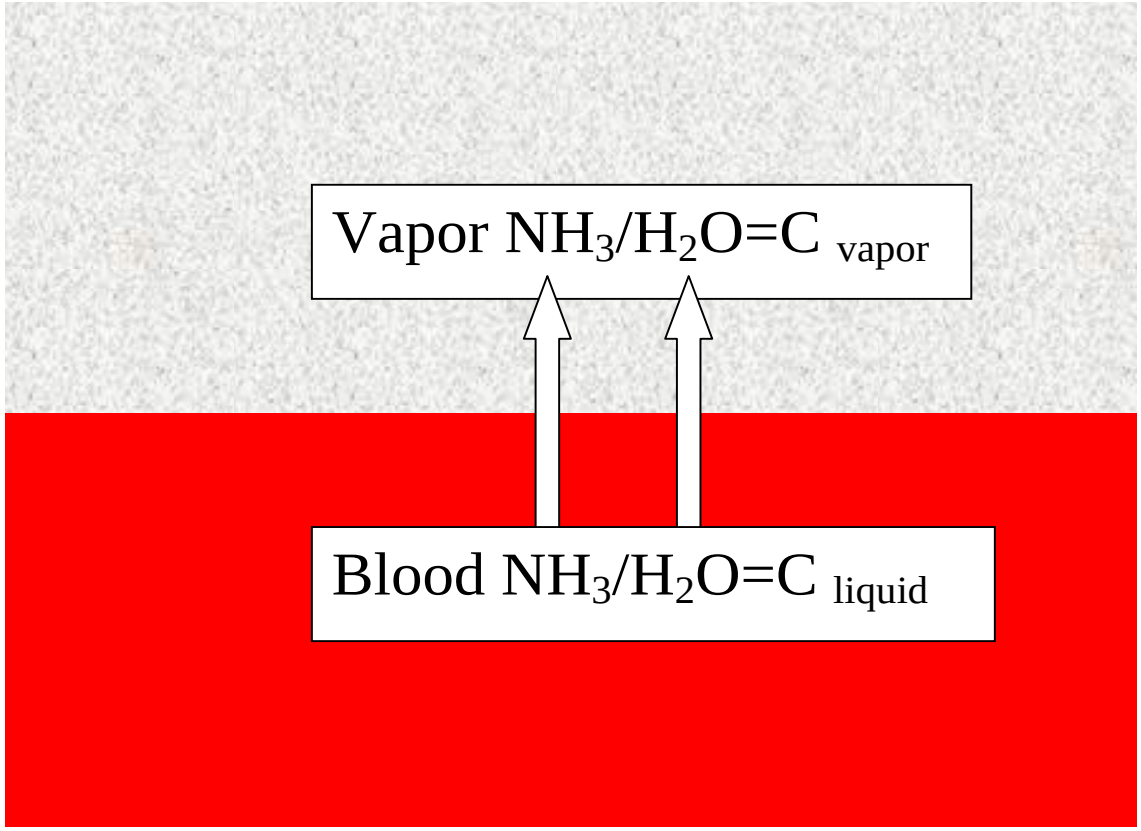
1. **Диодный лазерный спектрометр для скрининговой диагностики выдыхаемого воздуха по биомаркерам: 12CO2, 13CO2, CH4, H2S, NH3 (2010-2014).**

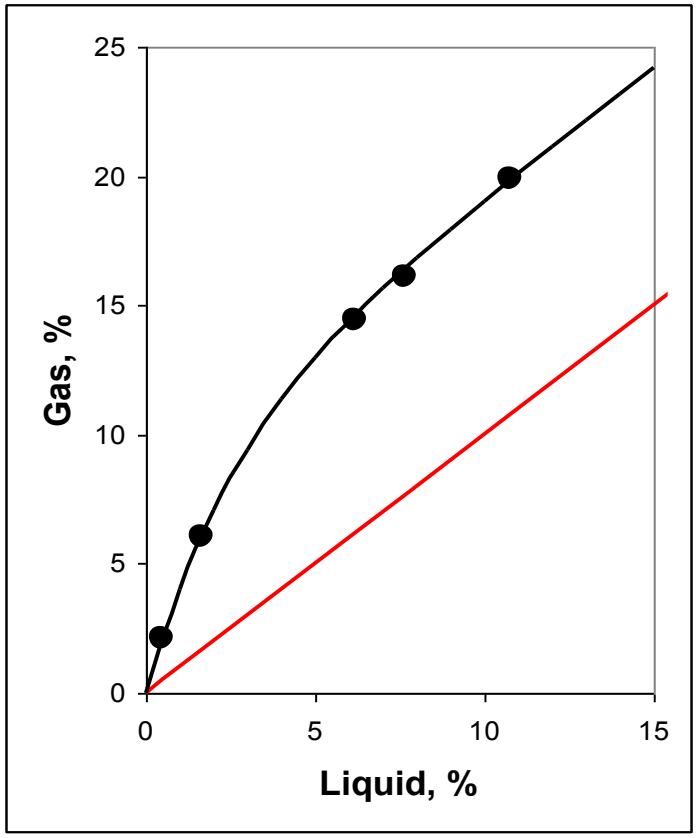
О чем свидетельствует обнаружение газообразных биомаркеров у человека?

- **H2O** – водяной пар, метаболизированная вода.
- **NH3** – аммиак, отражает состояние азотистого обмена в организме.
- **12CO2** – двуокись углерода, содержащий «легкую» фракцию углерода; является основным биомаркером ВВ, ассоциированный с ГДФ альвеол.
- **13CO2** - двуокись углерода, содержащий «тяжелую» фракцию углерода; образуется в основном в ЖКТ, ассоциирован с деятельностью *Bact. Helicobacter pylori ,* составляет основу газового пузыря в желудке. В атмосферном воздухе проветриваемых помещений находится в небольших количествах (≤1 ppm)
- **CH4** – метан, образуется в организме человека (кишечник, корни зубов в полости рта) и в природе путем «метанового брожения» при разложении органических веществ. «Базисный» уровень в атмосферном воздухе в пределах 2-4 ppm. В выдыхаемом воздухе содержание метана зависит от характера питания и наличия патологии ЖКТ.
- **H2S** – сероводород. Наличие сероводорода в ВВ свидетельствует о наличии гнилостных процессов в полости рта, респират.путях или ЖКТ.

ДЛ-спектрометр для скрининговой диагностики выделяемых газовых компонент NH3 и H2O с поверхности кожи ладоней

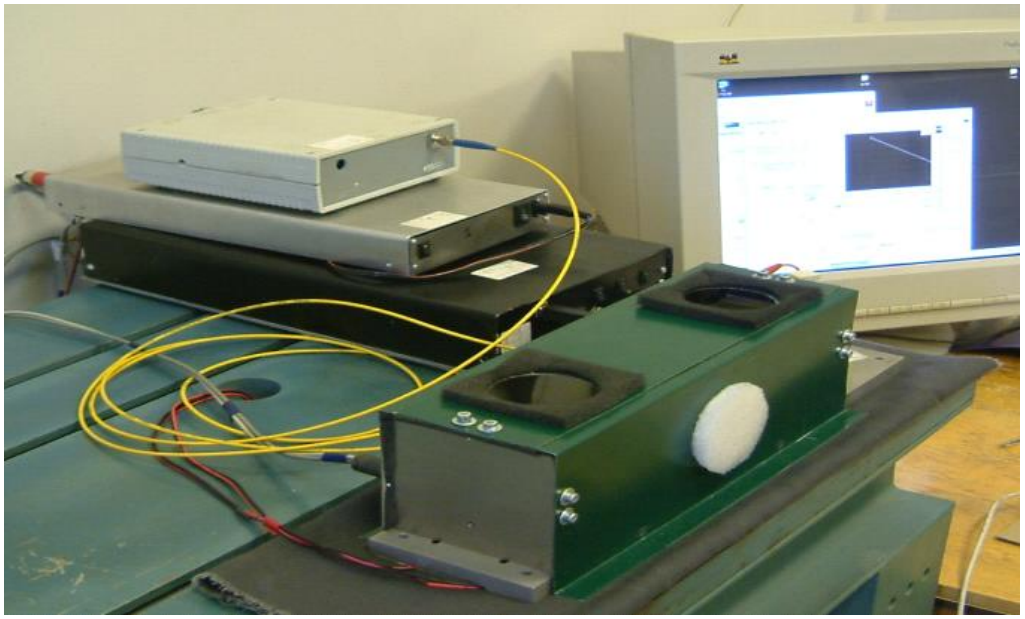
Измерение соотношения концентраций аммиака и паров воды, выделяемых с поверхности кожи, позволяет судить о концентрации растворенного в крови аммиака и скорости его выделения через капиллярную систему в коже ладони.



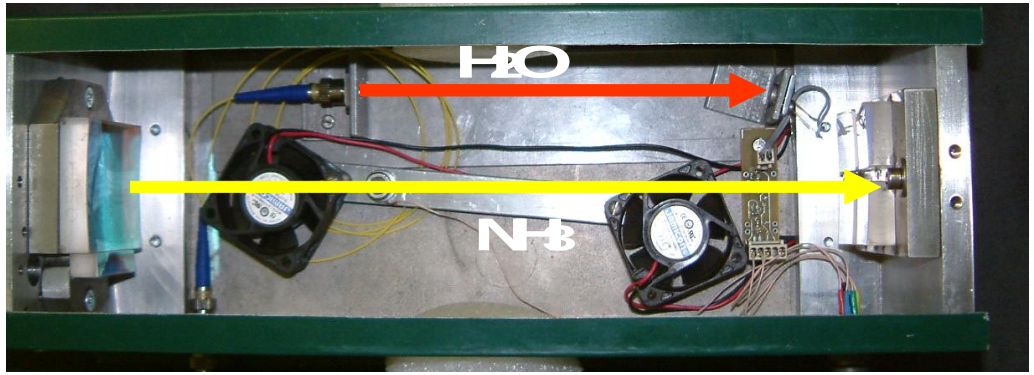


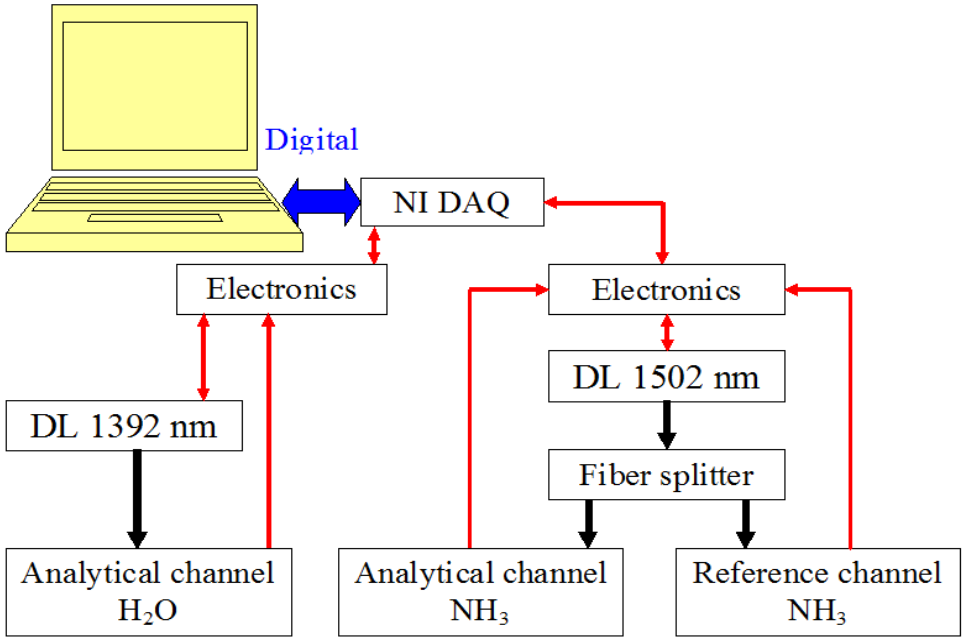
Известно, что в идеальном случае, концентрация примеси в газовой фазе равна ее концентрации в жидкой фазе (закон Рауля – красная прямая). На самом деле это не так. В наших исследованиях выявлено, что в слабом растворе аммиака в воде – концентрация NH3 в газовой фазе в 18 раз больше, чем в жидкой.

Экспериментальная установка для определения NH3 в испарениях пота ладоней



Внешний вид экспериментальной установки. Диодные лазеры с волоконным выводом излучения. Длина волны 1392 nm (H2O), 1502 нм (NH3).



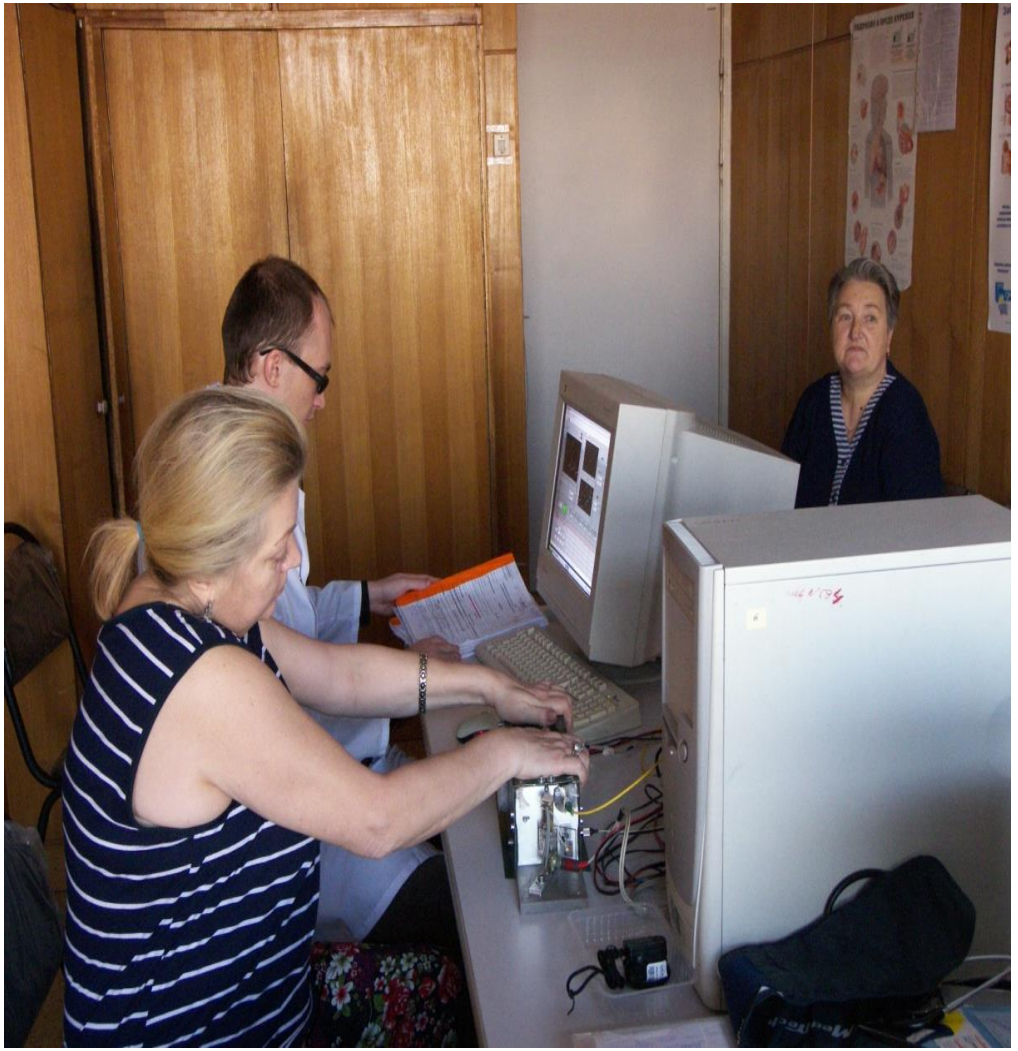


Блок-схема установки. Стрелки: синяя – канал цифровых сигналов, красные – каналы аналоговых сигналов, черные – оптические волокна.

Оптическая кювета изнутри. Внутри кожуха установлена многоходовая кювета Чернина (L NH3= 39 м), предназначенная для измерения содержания аммиака. Для измерения содержания водяного пара установлен канал с оптической длиной LH2O=15 см.

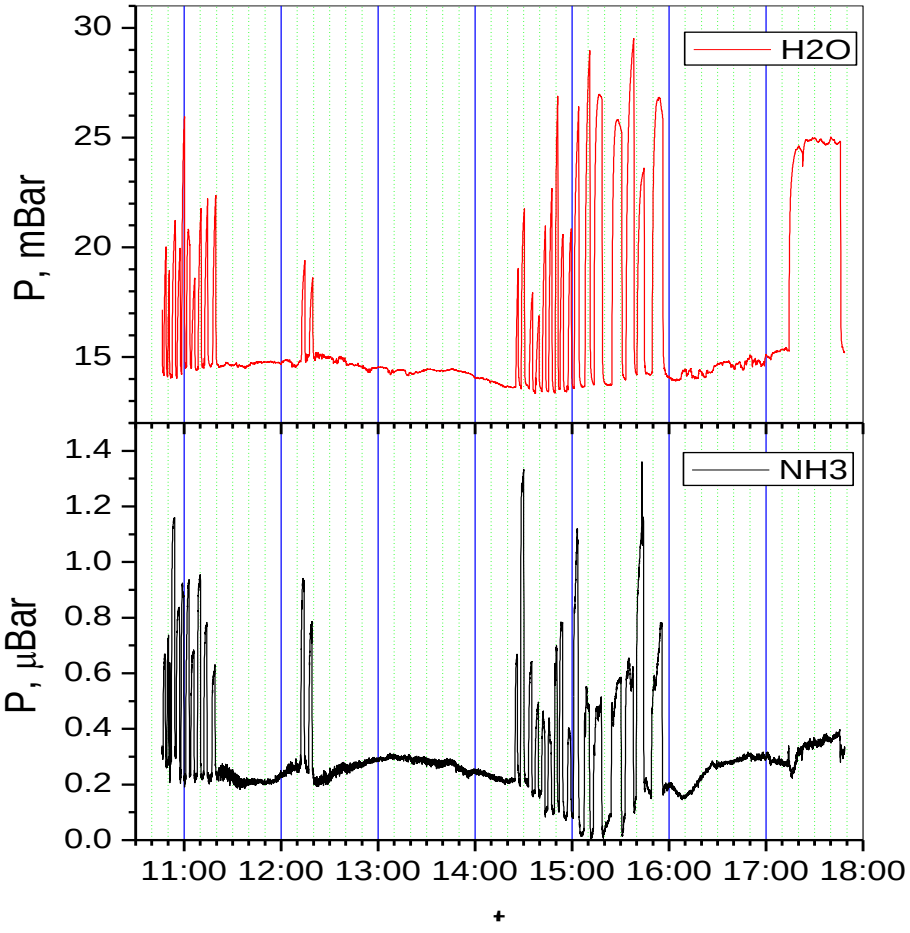
Клинико-функциональная оценка выделения NH3 в потовых испарениях ладоней при ДЛ-спектрометрии

- Совместно с кафедрой ГТ РНИМУ им. Н.И.Пирогова в ГКБ №12 проводятся клинико-физиологические исследо-вания на разработанном ДЛ-спектрометре с целью определения границ «нормы» и нахождения корреляций между отклонениями от «нормы» и наличием тех или иных изменений азотистого обмена по содержанию NH3 в конвектируемом воздухе.

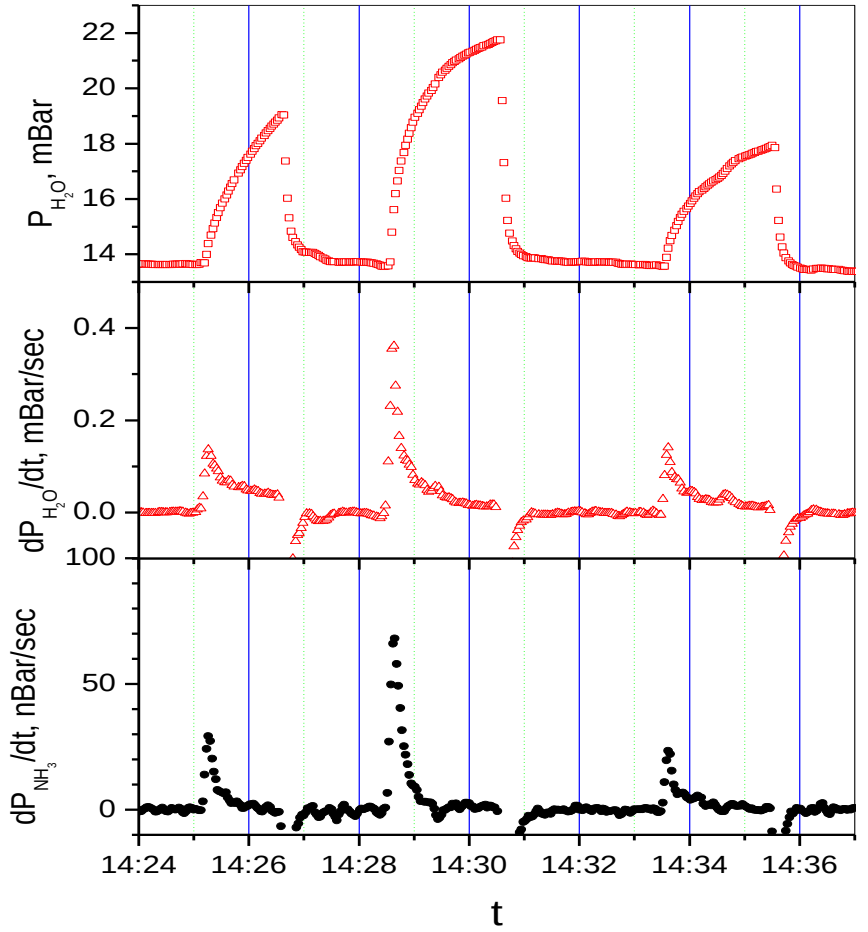


Экспериментальные результаты определения NH3 и H2O в испарениях пота ладоней

В тестовом эксперименте была исследована контрольная группа 20 пациентов

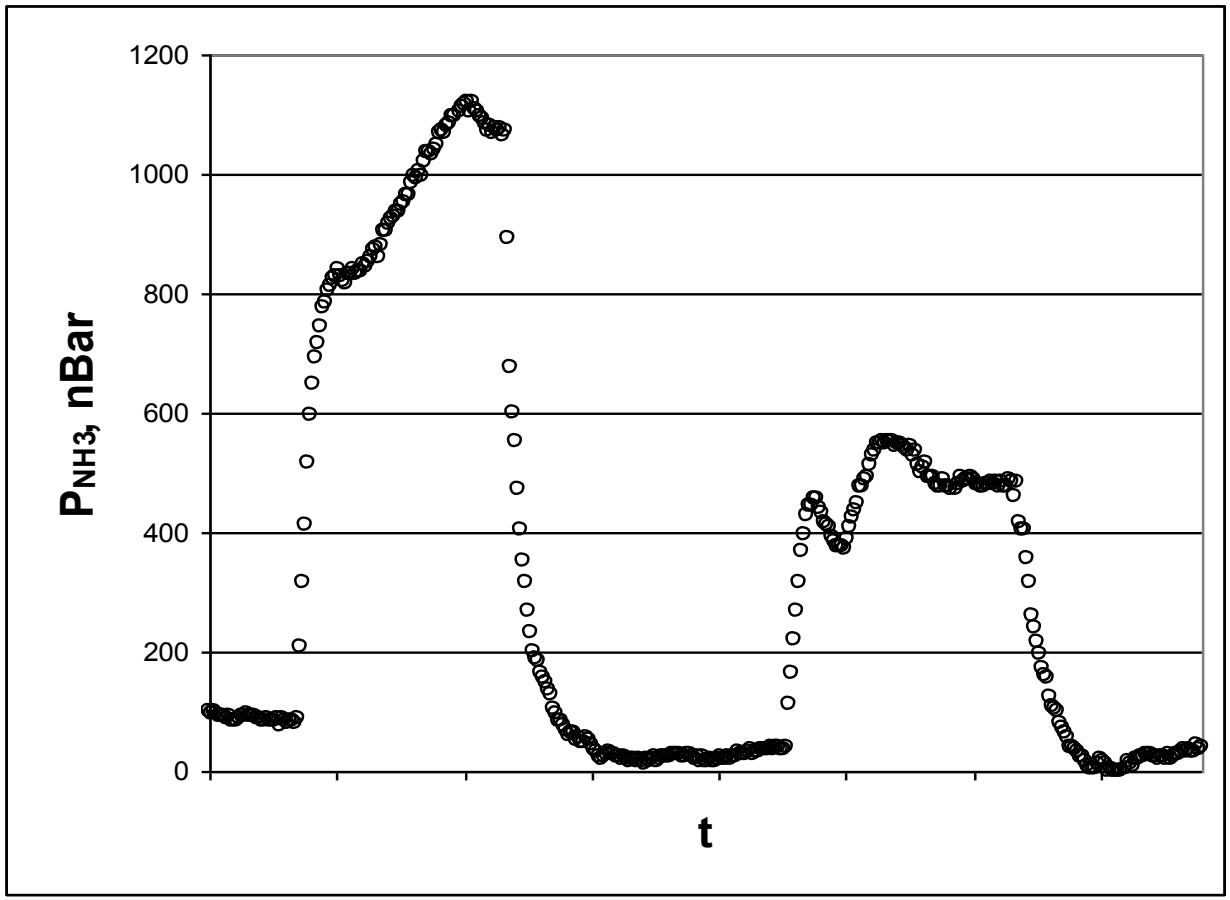


Измерения проводились до и после обеда. Каждый пик соответствует измерению одного обследуемого. Последний пик – влажная салфетка.



Фрагмент проведенного тестового измерения. Измеряемой величиной является отношение максимумов нижнего и среднего графиков.

Мойте руки перед едой



Измерение аммиака с ладоней до (слева) и после (справа) мытья рук.

После мытья рук устраняется дополнительный механизм появления аммиака с ладоней в данном эксперименте, который не связан с испарением.

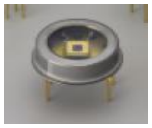
Возможно это результат капиллярного обмена или жизнедеятельности бактерий кожи ладоней.

Предварительные выводы скрининга с поверхности кожи

1. Измерение потока водяного пара может быть использована для скрининговой диагностики состояния капиллярной системы кровообращения и состояния кожи.
2. Определена “норма” отношения потока аммиака к потоку воды при испарении. Отступление от нормы может быть использовано для скрининговой диагностики состава крови, например, при азотемии.
3. Определена “норма” потока аммиака с ладони помимо испарения. Отступление от нормы может быть использовано для скрининговой диагностики состояния кожи.

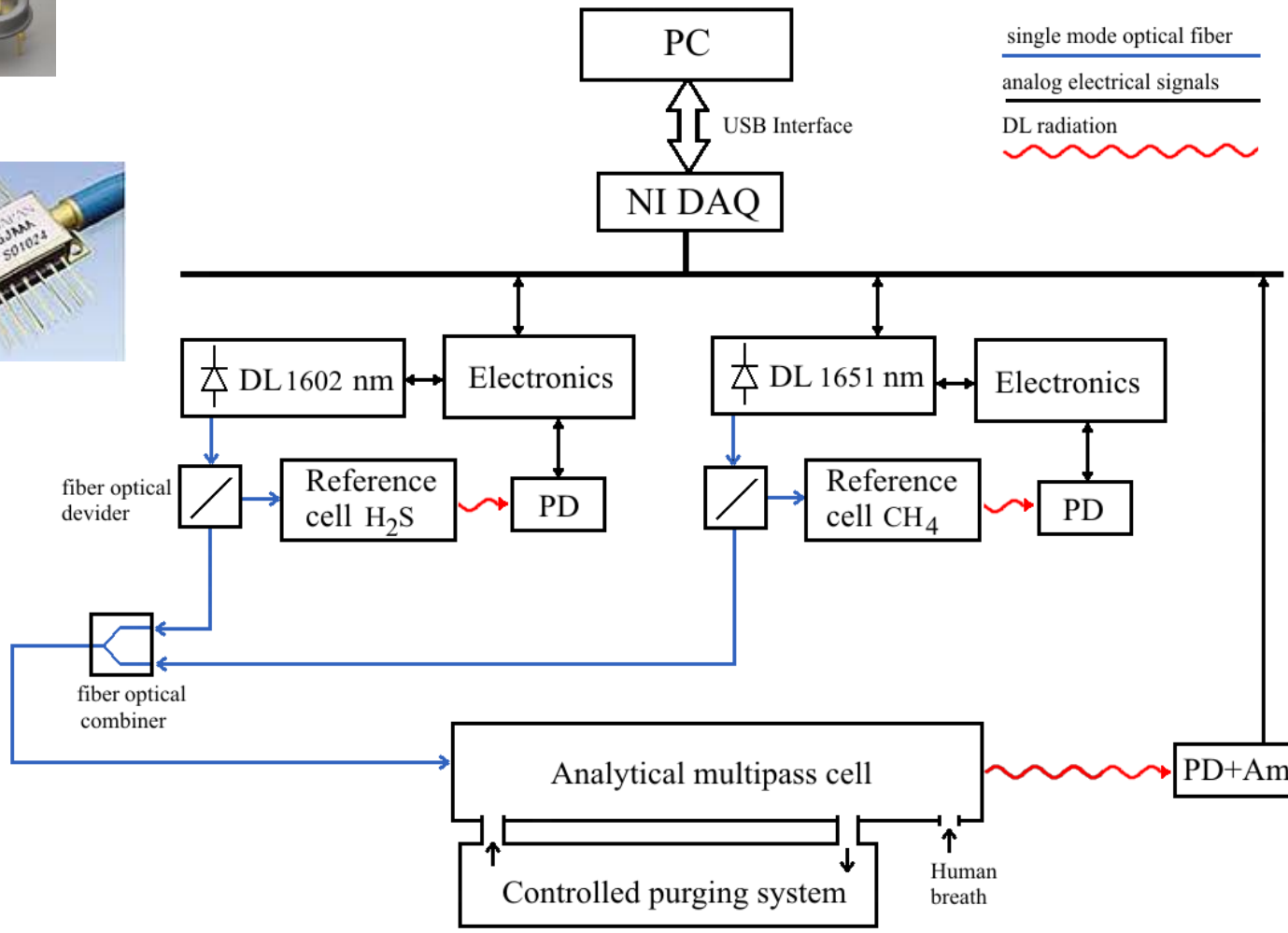
ДЛ- спектрометр для скрининговой диагностики ВВ по маркерам: 12CO2, 13CO2, CH4, H2S, NH3.

◆PD – Hamamatsu Photonics InGaAs photodiodes, ø 1 mm, D* = 1.5·1012 cm·Hz1/2/W



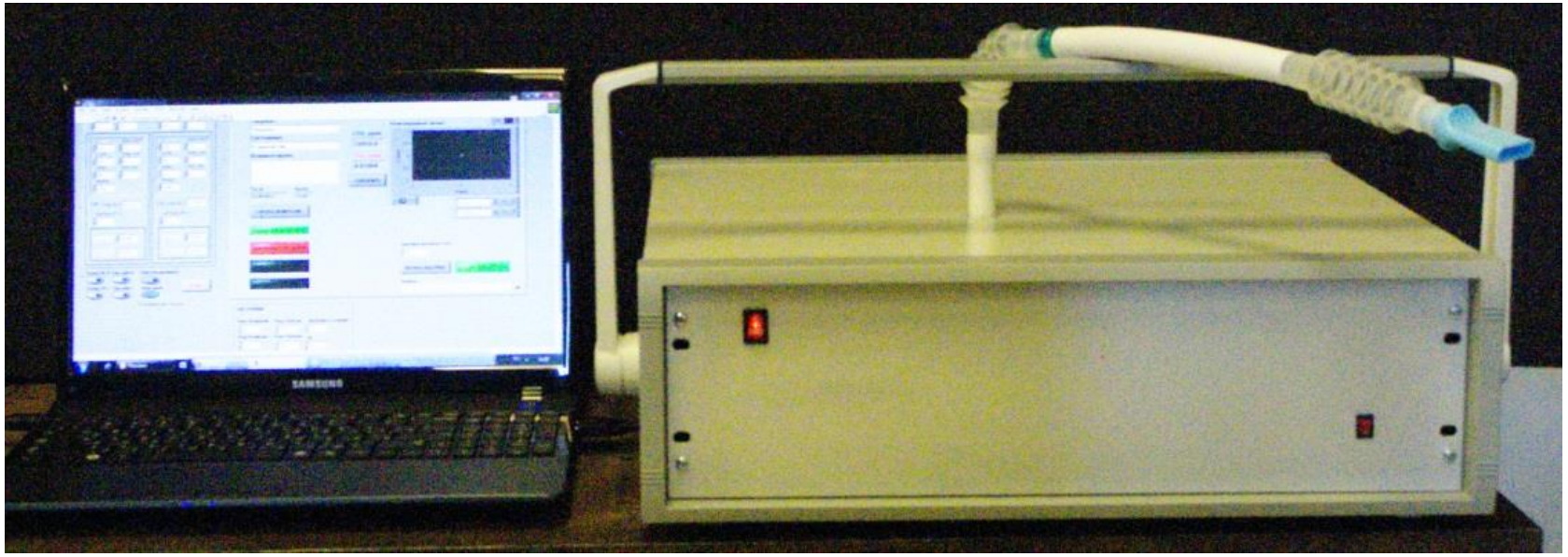
◆DL – NTT Electronics diode laser DFB, λ=1.65 μm and λ=1.60 μm fiber single mode, ø 1.3 μm P=15 mW. Pulse duration 1-2 ms

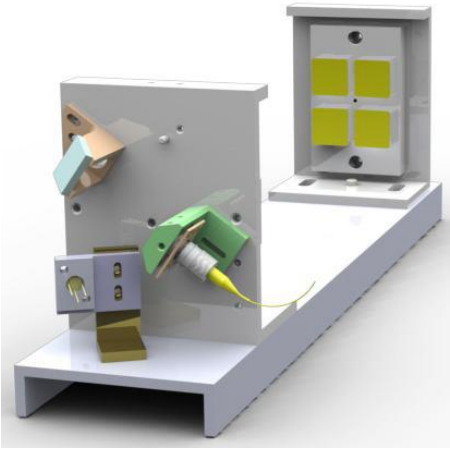
◆NI DAQ – National instruments multifunctional DAQ board NI USB 6289. Electronics – DL current and temperature control board, amplifiers.



Блок-схема ДЛ спектрометра

Компоненты ДЛ спектрометра





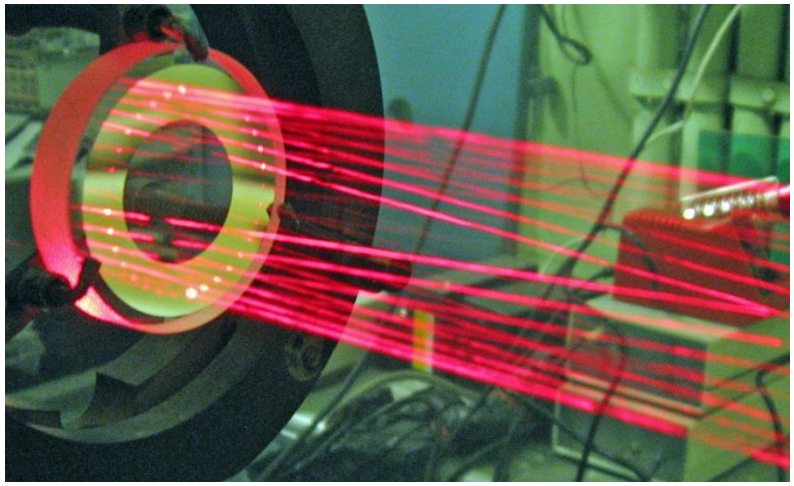
◆Кюветы сравнения – 2 стеклянные ячейки с реперными газами.
1 - H2S L=25 cm, P H2S =60 Torr in 1 Atm N2;
2 - CH4 L=4 cm, P CH4=56 Torr in 1 Atm N2

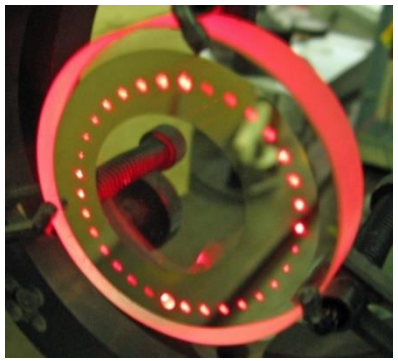
◆ Слева – аналитическая многоходовая кювета ”Chernin” База 25 cm, Общий опт.путь L=39 m, Объем 2,5 л.

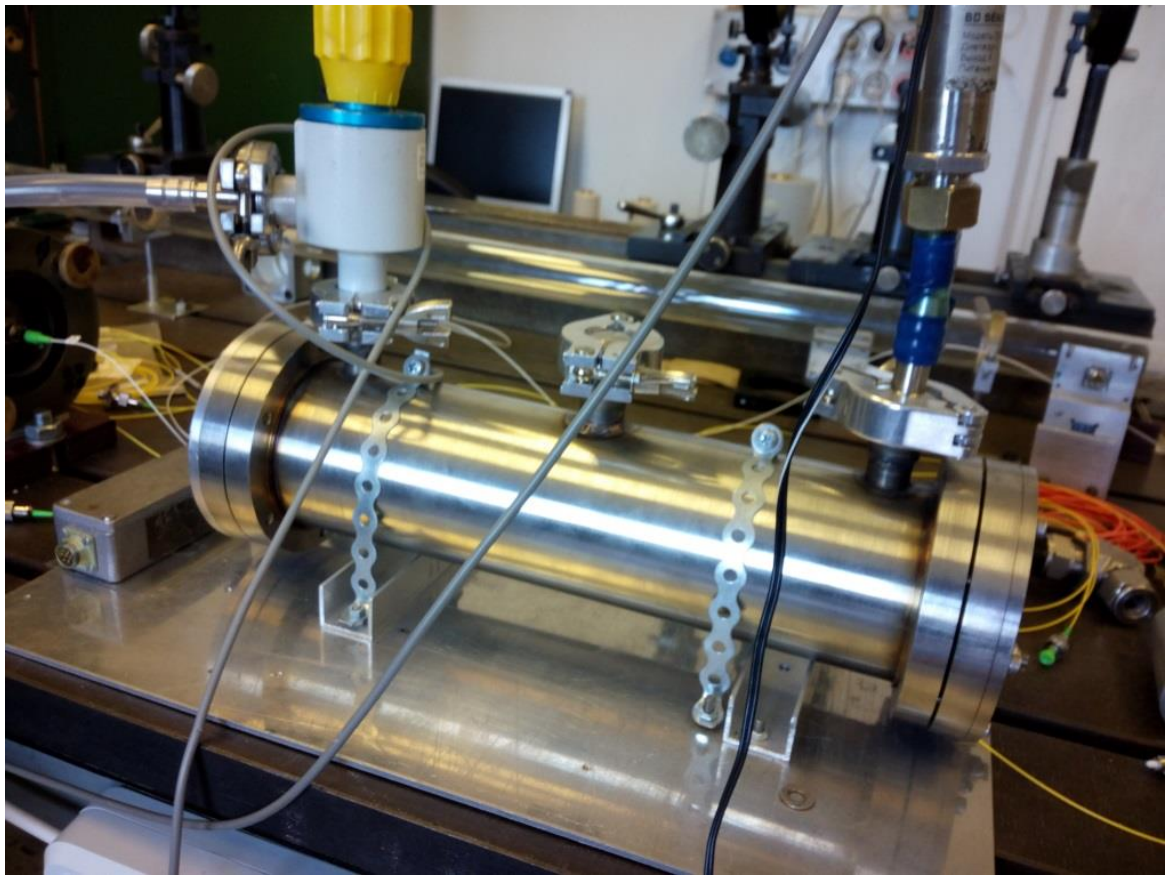
TDL spectrometer - modern design

Новая версия аналитической кюветы

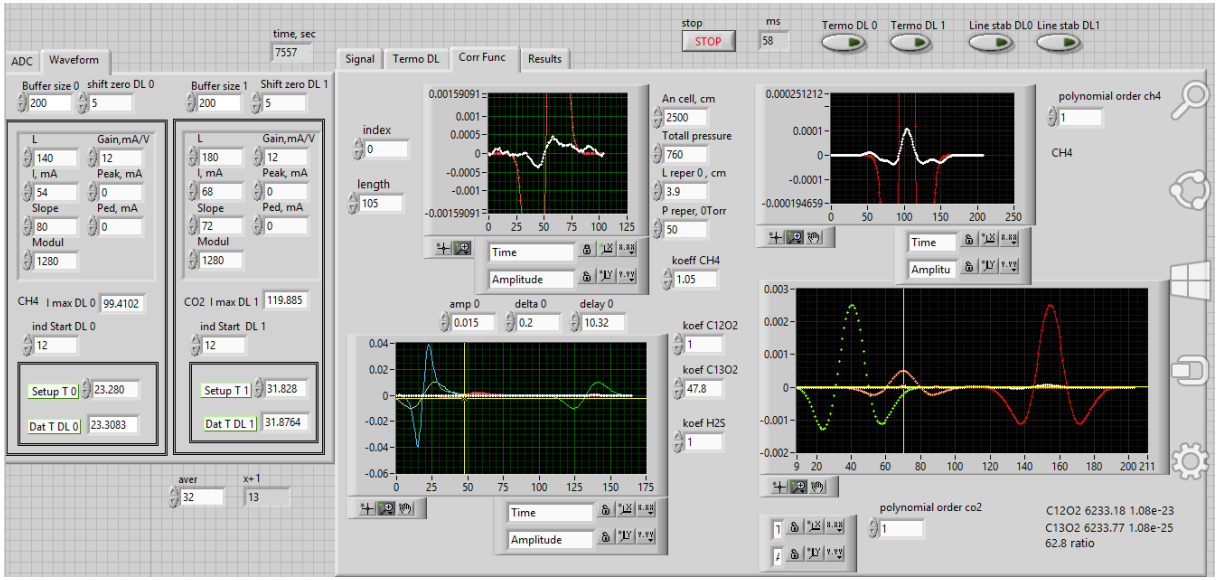
◆Аналитическая кювета - ”Herriott”. Базовая длина 30 cm,
Полный оптический путь 25 m, Объем 2.6 л.





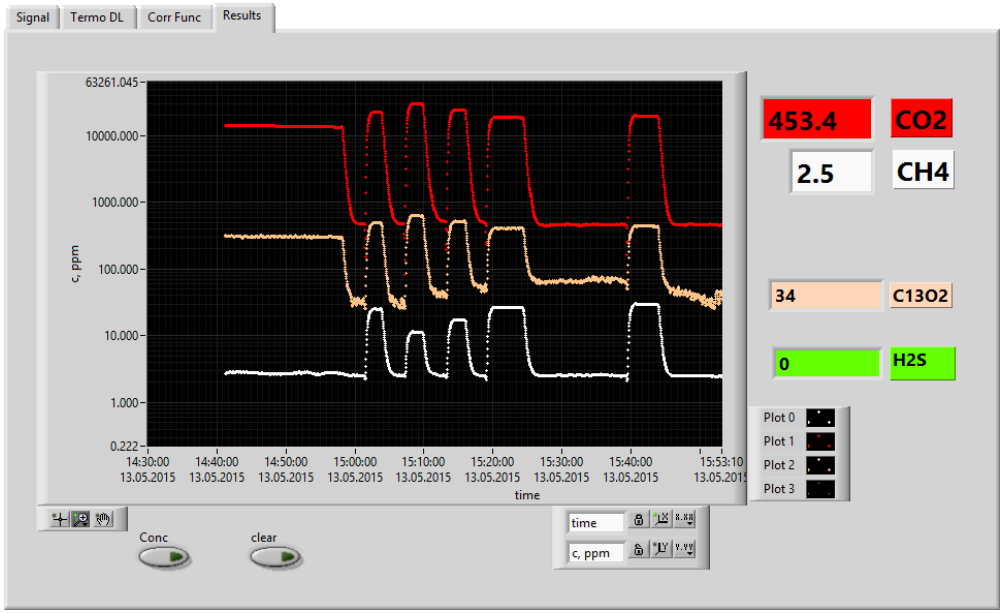


Программа управления ДЛС и обработки результатов измерений



◆ Слева- корреляционная процедура одновременной обработки результатов измерений для получения концентрации CH4, 12CO2, 13CO2, and H2S.

◆ Справа – визуализация измерений концентраций CH4, 12CO2, 13CO2, and H2S в реальном времени) на дисплее ноутбука.



Содержание газов (ppm) в атмосферном воздухе закрытых помещений клинического отделения больницы (01.08.2015; Т возд 25С; атм. давл. 765 мм.рт.ст.)

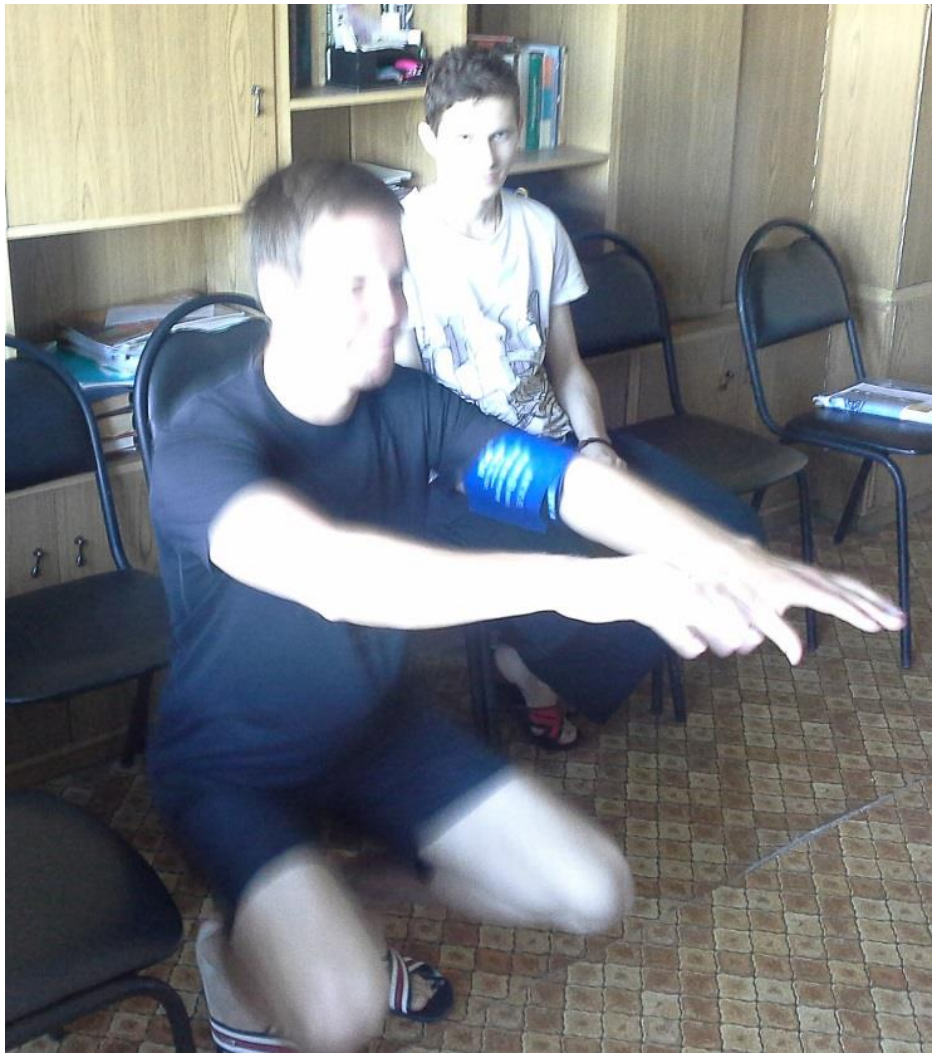
Помещение/газы	CO2	CH4	13CO2	H2S
Ординаторская	**402,8**	**2,3**	**0**	**0**
Пост 1	**424,9**	**2,3**	**0**	**0**
Пост 2	**369**	**2,2**	**0**	**0**
Санузел	**363,2**	**2,3**	**0**	**0**
Палата общая	**451,7**	**2,2**	**0**	**0**
Сестринская	**414,2**	**2,3**	**0**	**0**
Столовая	**643,8**	**2,4**	**0**	**0**
Учебная комната	**561,7**	**2,7**	**0**	**0**

Этапы газоанализа
Оценка исходного состояния

Для проведения газоанализа выдыхаемого воздуха предварительно собирают порции выдоха в пластиковую емкость (воздухоприемник -1) с клапаном, блокирующим утечку воздуха.

Этапы газоанализа
Тест с физической нагрузкой (приседание)

Обследуемому предлагается тест с физической нагрузкой в виде приседаний до достижения уровня умеренной ФН (ЧСС не более 140 уд/мин). Одновременно фиксируются другие показатели функционального состояния (АД, ЧД, SpO2, глюкоза крови)

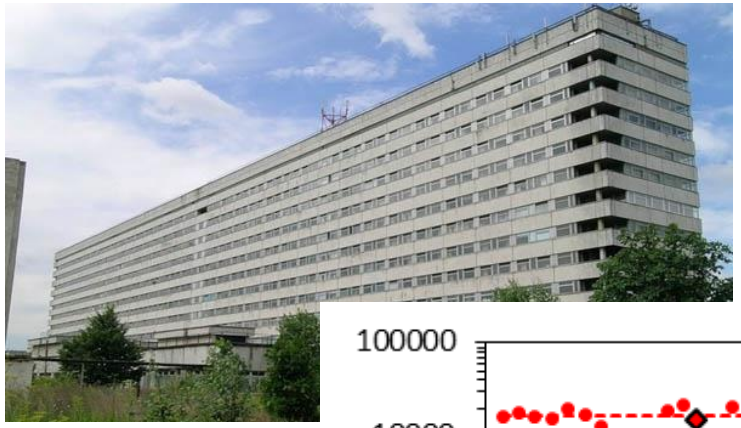


Этапы газоанализа
Измерение показателей газоанализа в ДЛ-спектрометре

Полученные порции выдыхаемого воздуха в покое, на высоте ФН и после восстановления перемещаются в газоаналитическую камеру ДЛ-спектрометра через входную трубку (2).

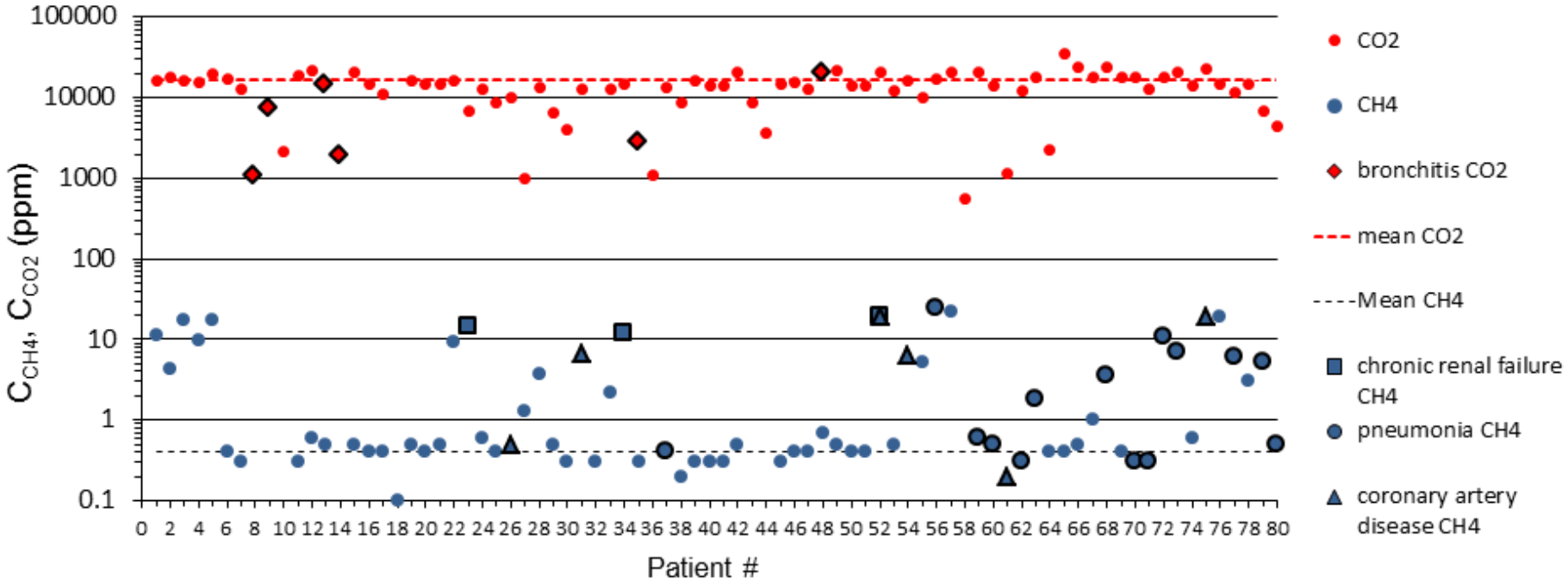
Клинические тесты

◆ ДЛ- спектрометр в настоящее время проходит клиническую апробацию в ГКБ №12, г. Москва. Проведены обследования 150 добровольцев (72 мужчин, 78 женщин в возрасте от 19 до 78 лет) с известным диагнозом: сахарный диабет, гастрит, бронхит, пневмония, хроническая обструктивная болезнь легких, цирроз печени, хроническая почечная недостаточность, гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца в фазе компенсации при стабильно удовлетворительном состоянии.



Слева - ГКБ №12

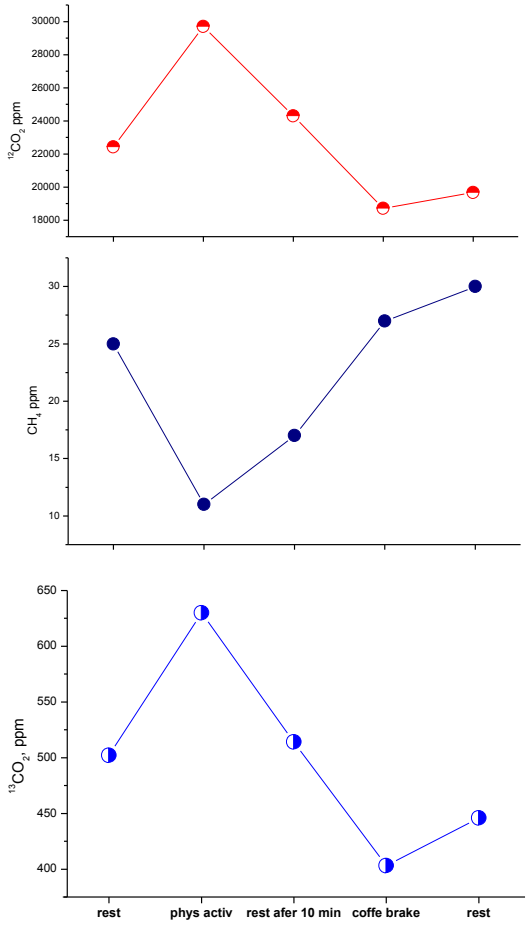
Спарва –типичный протокол испытаний пациентов на наличие концентраций 12CO2 и CH4 (в покое); выявляются отклонения этих биомаркеров ВВ у пациентов с различной патологией.



Результаты комплексного анализа газообразных метаболитов в выдыхаемом воздухе при различных физиологических состояниях.

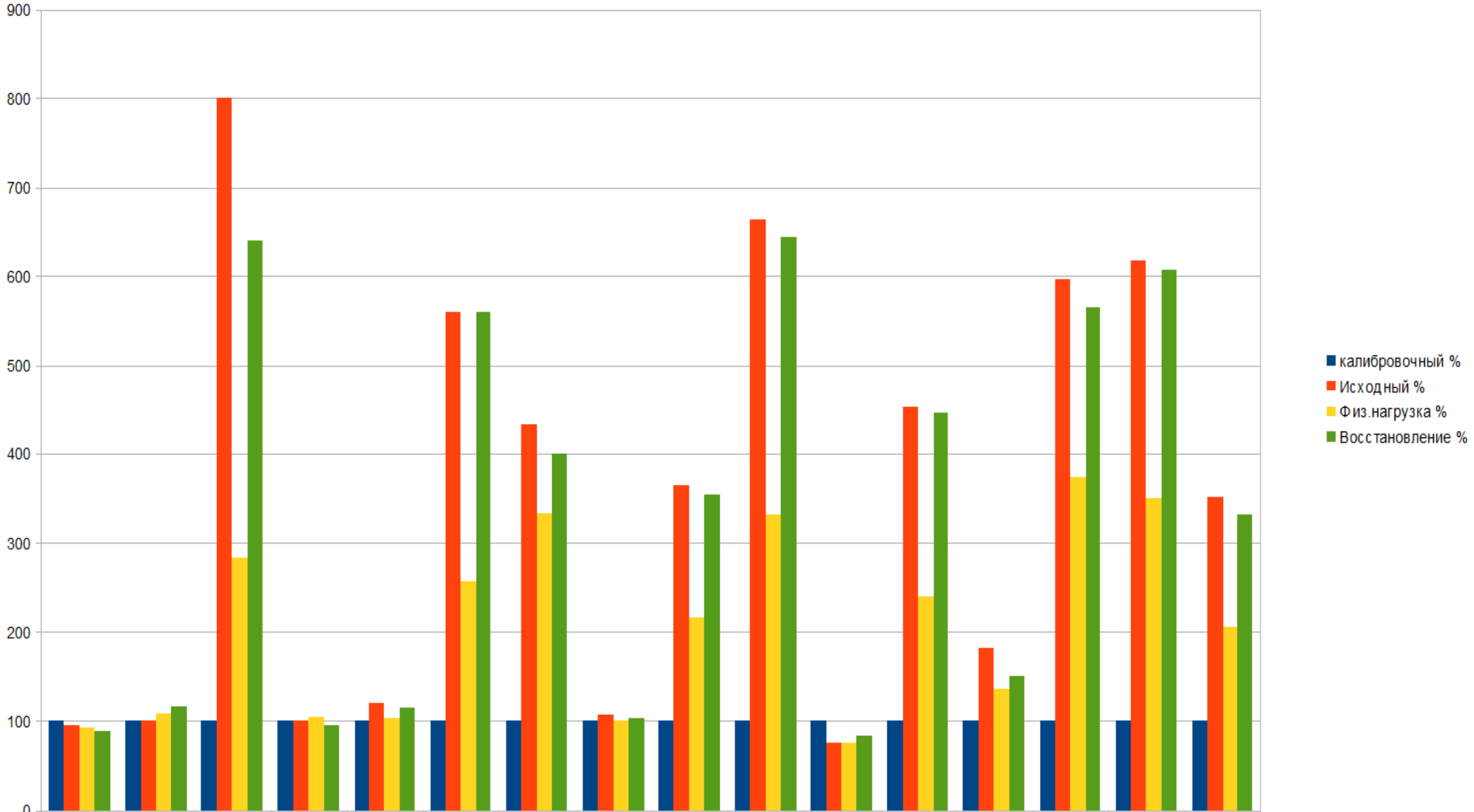
Иллюстрация динамики выдыхаемого газов в различных условиях (пациент 72 лет, 10.06.2015 время с 13.00 до 14.30)

Parameters	Baseline calibration	State of rest [13.00 hh.mm.]	Physical activity [13.10 hh.mm.]	State of rest 10 minutes. [13.20 hh.mm.]	After 30 min. after meals [14.15 hh.mm.]
CO_2 (ppm)	495	16480	22150	15400	17930
$^{13}CO_2$ (ppm)	34	165	185	154	317
CH_4 (ppm)	2,5	14	6,4	14	21
H_2S (ppm)	0	0	0	0	0
Respiratory rate (breath/min)	-	18	28	20	18
Blood pressure (mm Hg.CT.)	-	140/80	150/80	140/80	130/80
Heart rate (beats/min)	-	86	115	90	89
SpO_2 (%)	-	97,00%	97,00%	98,00%	98,00%
Blood glucose (mmol/l)	-	4,4	4,1	3,9	5,9

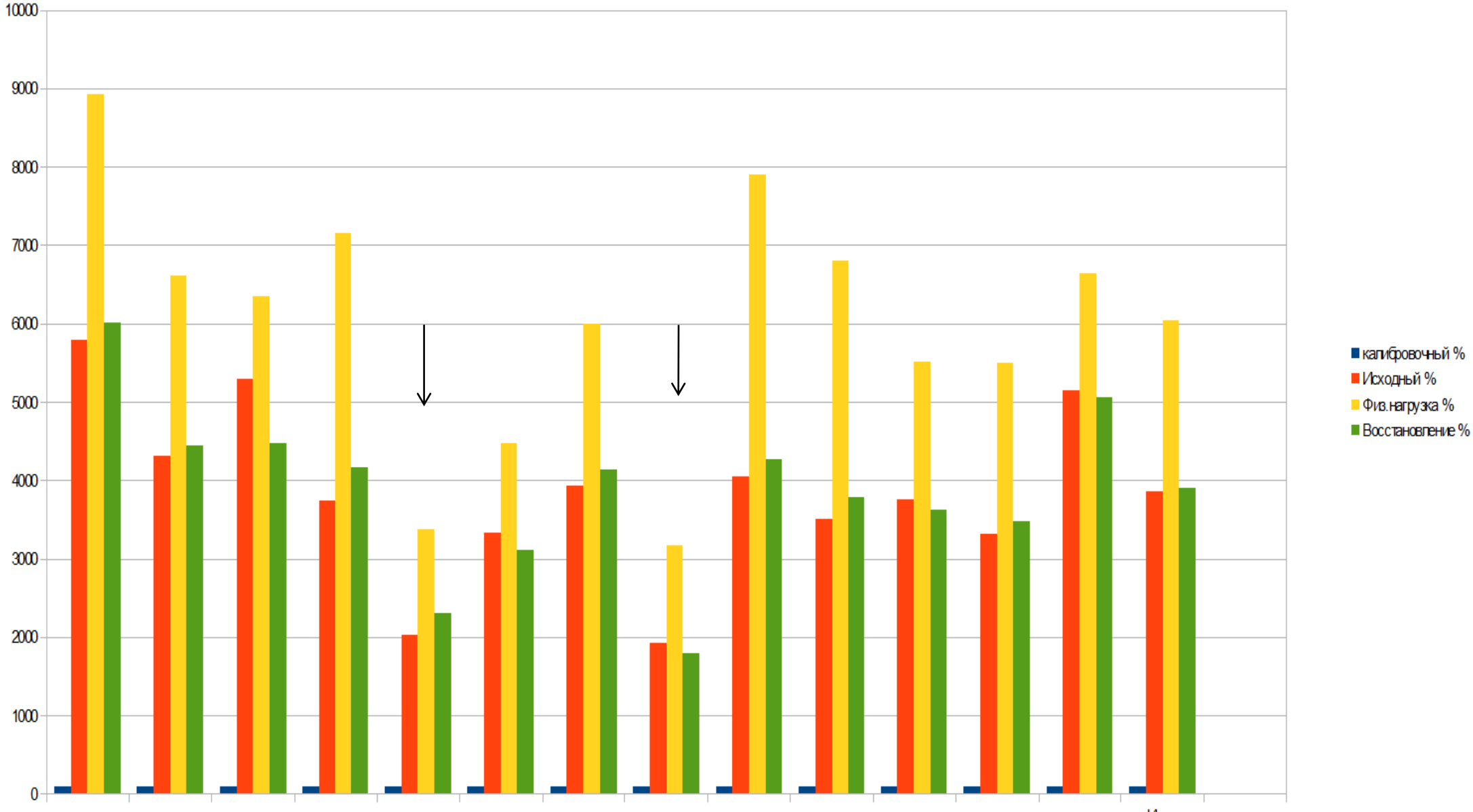


Динамика именения концентрации биомаркеров при различных физических нагрузках.

Динамика % содержания CH4 в выдыхаемом воздухе в покое, при физической нагрузке и восстановительном периоде (оценивается характер питания и тип метаболизма с «выгоранием» CH4 на высоте ФН у «мясоедов»)



Динамика % содержания CO2 в выдыхаемом воздухе в покое, при физической нагрузке и восстановительном периоде (оценивается газодиффузионная функция в альвеолах)



Основные результаты исследования

1. Впервые разработан мобильно доступный низко-энергетический инфракрасного диапазона ДЛ-спектрометр, позволяющий одновременно определять многокомпонентный химический состав атмосферного и выдыхаемого воздуха в разнообразных условиях внешней среды и функционального состояния человека.
2. При исследовании азотовыделения в составе испарений пота ладоней определены границы концентраций NH3 для состояния «норма» и «азотемия», т.е может отображать шлаковый метаболизм при ХПН.. Причем, обработка рук теплым мыльным раствором на некоторое время прекращает азотовыделение из потовых желез, что обусловлено состоянием капиллярного (микроциркуляторного) русла или влиянием загрязнения сапрофитной микрофлорой кожи ладоней.
3. Возможность определения химического состава атмосферного воздуха имеет важное эколого-гигиеническое значение в определении чистоты воздуха и его контроля, т.е. характеризует микроэкологию человека в замкнутом пространстве. Повышение концентрации газов 12CO2, 13CO2, CH4 и H2S в атмосферном воздухе свидетельствует о той или иной степени его загрязнения.

Основные результаты исследования

4. Определение в химическом составе ВВ биомаркеров в виде конечных продуктов метаболических процессов 12CO2, 13CO2, CH4, и H2S в состоянии покоя обследуемого выявляет базисный функциональный уровень, связанный с нарушением газодиффузионной функции легких, либо с нарушением процессов гастродуоденального пищеварения, ассоциированного с *B. Helicobacter pylori ,* характером питания (например, «мясоеды» – исходно увеличенным содержанием CH4 и 13CO2), а также со снижением основного обмена.

5. При проведении тестов с дозированной умеренной физической нагрузкой у добровольцев отмечалась закономерная динамика биомаркеров ВВ, которая сопровождалась значимым повышением выделения «тяжелой» и «легкой» фракций CO2, а также «выгоранием» (снижением) содержания CH4. Лишь в тех случаях, когда имелась выраженная гнилостная реакция несанированной полости рта, отмечалось некоторое увеличение содержания H2S. У части обследуемых с явлениями компенсированной ЛСН в покое и при нагрузке отмечалось уменьшение показателей выделяемого 12CO2, что указывало на более значимую дисфункцию кардио-респираторной системы и газодиффузионные нарушения. Это параллельно подтверждалось снижением кислородной сатурации тканей (SpO2).

Основные результаты исследования

6. В восстановительном периоде после нагрузки у абсолютного большинства обследуемых (95,5%) наличие исследуемых биомаркеров ВВ приходили к значениям исходного состояния, за исключением более длительно сохраняющейся тенденции к снижению уровня гликемии.
7. Ввиду неоднородности групп обследуемых, неполного выполнения разработанного нами протокола исследования на ДЛ-спектрометре, считаем полученные количественные показатели биомаркеров ВВ отнести к ориентировочным, но пригодным для скрининговой оценки по выявлению симптомов несостоятельности функций, обусловленных нарушением метаболических процессов, связанных с вероятной патологией.
8. Считаем, что принцип ДЛС биомаркеров ВВ в скрининговой неинвазивной оценке функционального состояния человека имеет важное значение в клинико-физиологических исследованиях. Поэтому необходимо направить все материальные, технические и организационные возможности для разработки новых отечественных моделей ДЛ-спектрометров и быстрого внедрение методаов ДЛ-исследования биомаркеров ВВ в практическое и научное русло здравоохранения, спортивной медицины и эколого-гигиенических разработок..

Благодарю за внимание!