

**ВЫЯВЛЕНИЕ НАИБОЛЕЕ СПЕЦИФИЧНЫХ ЛЕТУЧИХ МЕТАБОЛИТОВ МЕТОДОМ
ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ПРОБАХ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА БОЛЬНЫХ РАКОМ
ЛЕГКИХ И ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ**

В.И. Скоморощенко

Научный руководитель: доцент, к.х.н., В.В. Шелковников

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: skomoroshchenko@mail.ru

**IDENTIFICATION OF THE MOST OF SPECIFIC VOLATILE METABOLITES BY GAS
CHROMATOGRAPHY IN THE SAMPLES OF EXHALED BREATH OF LUNG CANCER PATIENTS
AND HEALTHY VOLUNTEERS**

V.I. Skomoroshchenko

Scientific Supervisor: docent, Ph.D., V.V. Shelkovnikov

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: skomoroshchenko@mail.ru

***Annotation.** Today special perspective has non-invasive diagnosis of bronchopulmonary diseases, based on the analysis of the component composition of exhaled breath. In this work, the most of specific volatile metabolites were determined based on the component composition of exhaled breath using gas chromatography in conjunction with solid phase microextraction. Such an analysis is relevant and promising approach for the development of new methods of research and diagnostics in biomedicine.*

Введение. Бронхолегочные заболевания дают основной вклад в смертность от онкологических заболеваний. Это обусловлено тем, что 84% случаев диагностируется на поздних стадиях. Например, в мире в 2008 году было выявлено 1,5 млн. случаев с раком легких и 1,3 млн. смертельных исходов от данной формы онкологии [1].

На сегодняшний день особые перспективы имеет неинвазивная диагностика бронхолегочных заболеваний на основе анализа компонентного состава проб выдыхаемого воздуха (ПВВ) [3]. Выдыхаемый пациентом воздух содержит летучие органические метаболиты, которые могут использоваться в качестве потенциальных биомаркеров для диагностики различных патологических состояний бронхолегочной системы на ранней стадии [4].

Цель настоящей работы – разработка газохроматографической методики определения летучих органических соединений (ЛОС) в пробах выдыхаемого воздуха.

Экспериментальная часть. Качественное определение ЛОС в пробах выдыхаемого воздуха осуществляли с использованием комплекса, состоящего из газового хроматографа Finnigan Trace GS и масс-спектрометра Finnigan Trace DSQ при следующих оптимальных условиях: способ ионизации - электронный удар; колонка - Supel-Q™ PLOT длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм (производитель Thermo Scientific); температура испарителя – 200 °С; температура интерфейса – 200 °С;

температура термостата – 40 °С в течение 1 мин, увеличение температуры до 250 °С со скоростью 10 °С/мин; газ-носитель – гелий (марка «60»); диапазон сканирования масс 50–650 а.е.м.

Следует отметить, что уровень концентрации летучих соединений в воздухе очень мал, следовательно, используемый аналитический метод должен включать в себя этап концентрирования. Альтернативой этим методам является твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ), которая позволяет достичь пределов обнаружения летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе на уровне 1 ppm и ниже.

Выдыхаемый воздух пациентов отбирался при помощи пробоотборника Bio-VOC breath sampler объемом 100 мл. Концентрирование ЛОС осуществляли из пробоотборника путем погружения иглы шприца Supelco, содержащей внутри нее для инъекции стержень, покрытый неподвижной жидкой фазой состава Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) 85 мкм, в анализируемый воздух. Для полноты извлечения веществ, время адсорбции составляло 30 мин при комнатной температуре.

Обработку полученных данных проводили в программе Qual Browser программного обеспечения Xcalibur. Для идентификации летучих органических соединений полученные спектры веществ в анализируемой пробе сравнивали со спектрами веществ в библиотеке масс-спектров NIST MS Search 2.0.

Использование газохроматографического анализа позволяет довести технологию диагностики рака легких на основе исследования летучих метаболитов в выдыхаемом воздухе до уровня рутинных применений. Поэтому в рамках клинического исследования было решено перенести методику определения летучих метаболитов на газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, с целью понижения стоимости анализа и демонстрации возможности использования газохроматографического оборудования в этой области исследования.

Идентификацию веществ методом газовой хроматографии осуществляли по временам удерживания компонентов. Для этого использовались индивидуальные вещества, которые представляли собой Государственные стандартные образцы (ГСО) и стандартные образцы предприятия (СОП). Образцы вводились с помощью газового микрошприца в количестве 0,2 мкл в устройство ввода пробы газового хроматографа «Хроматэк–Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектором при оптимальных условиях, разработанных для анализа на хромато-масс-спектрометре Thermo Scientific.

На рисунке 1, в качестве примера, приведена типичная хроматограмма анализа выдыхаемого воздуха больного раком легких. По временам удерживания на хроматограммах в условиях ГХ-анализа идентифицировано 19 компонентов. Хочется отметить, что по сравнению с выдыхаемым воздухом здорового человека в выдыхаемом воздухе больного раком легких присутствует большее количество компонентов.

Результаты. При проведении количественного расчета измеряли отклик анализируемого компонента на регистрируемой хроматограмме и по построенной градуировочной зависимости рассчитывали его концентрацию. На основе полученных результатов выявлены наиболее специфические летучие метаболиты с точки зрения разделения пациентов, страдающих раком легких и здоровых добровольцев.

Результаты исследований показали, что метиленхлорид, пентан, ацетонитрил, толуол присущи больным раком легких и здоровым, с изменением вклада, следовательно, в качестве наиболее специфичных метаболитов они могут использоваться только с применением методов статистической

обработки. У всех больных раком легких обнаруживается О-ксилол, следовательно, его можно использовать как достаточное условие в качестве наиболее специфичного летучего метаболита с точки зрения разделения больных раком легких и здоровых добровольцев. Кроме того, при раке легких наблюдается повышенное содержание алканов, таких как гексан, октан и декан, производных бензола, а также этилацетата и N-этилформамида

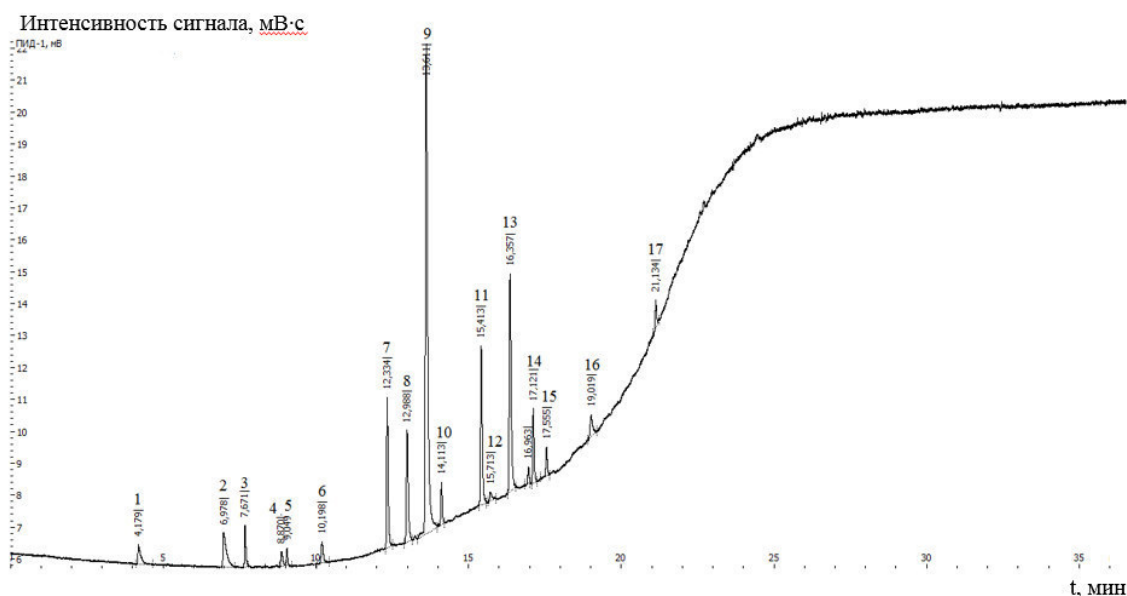


Рис. 1. Хроматограмма выдыхаемого воздуха больного раком легких:

1 – метанол; 2 – этанол; 3 – ацетонитрил; 3 – ацетон; 5 – метилхлорид; 6 – пентан; 7 – этилацетат; 8 – гексан; 9 – бензол; 10 – хлоропропиленоксид; 11 – N-этилформамид; 12 – октан; 13 – толуол; 14 – бутилацетат; 15 – хлорбензол; 16 – о-ксилол; 17 – декан

Закключение. Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности использования газовой хроматографии совместно с ТФМЭ в рамках клинического исследования состава выдыхаемого воздуха на уровне микроконцентраций детектируемых веществ.

Такой анализ является актуальным и перспективным подходом для развития новых методов исследований и диагностики в биомедицине и может использоваться как в целях выявления заболевания на ранних стадиях, предсказания реакции организма на конкретный вид лечения, так и для мониторинга эффективности проводимой терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Almond L. M., Barr H., Wood J., Hutchings J., Kallaway C. Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics // Stone Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2013 – № 10. – P. 207–219.
2. Silva C.L., Passos M., Camara J.S. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry // Brit. J. Cancer. – 2011. – Vol. 105. – P. 1894–1904.
3. Qin T. et al. Song G. Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients // Lung Cancer. – 2010. – № 67. – P. 227–231.