

## НЕИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПО КОНДЕНСАТУ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА И ИХ ЗНАЧЕНИЕ НА ПРИМЕРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА

Акад. Г. И. СИДОРЕНКО, канд. мед. наук М. Г. КОЛЯДКО, С. Ф. ЗОЛОТУХИНА

### NON-INVASIVE METHODS OF DIAGNOSIS USING EXHALED AIR CONDENSATE AND THEIR SIGNIFICANCE WITH THE EXAMPLE OF CHOLESTEROL ESTIMATION

G. I. SIDORENKO, M. G. KOLIADKO, S. F. ZOLOTUKHINA

Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск,  
Беларусь

**Обсуждаются перспективы неинвазивных методов исследования в клинической практике. Детально рассмотрены диагностические возможности, связанные с конденсатом выдыхаемого воздуха. Предложен новый метод определения уровня общего холестерина в конденсате, что открывает диагностические возможности в клинике и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний.**

*Ключевые слова: неинвазивный метод.*

**The prospects of non-invasive methods of investigation in clinical practice are discussed. Diagnostic capabilities associated with exhaled air condensate are analyzed in detail. A new method of total cholesterol estimation in the condensate, which opens diagnostic capabilities in treatment and prevention of cardiovascular diseases, is suggested.**

*Key words: non-invasive method.*

Сложна структура современной кардиологической диагностики: сюда входят функциональные инструментальные методы и биохимическая диагностика, психологическое тестирование и генетическое исследование.

Надвигающаяся эпидемия сердечно-сосудистых заболеваний вносит существенные поправки в демографическую ситуацию развитых стран. Это побуждает непрерывно совершенствовать систему крупномасштабной профилактики [1].

Для того чтобы добиться эффективности профилактики, необходимо обеспечить возможность количественной оценки факторов риска как в популяции, так и у отдельных индивидуумов. Это позволит контролировать эффективность профилактических и лечебных мероприятий и создаст необходимую мотивацию.

Если некоторые факторы риска могут контролироваться сравнительно просто (курение, вес тела, артериальное давление), то другие, сильные и независимые факторы риска остаются как бы замаскированными. Это относится, например, к поиску оптимальной физической активности [2]. Значительно более сложна ситуация с определением метаболических факторов риска.

Широкое использование методик определения необходимых параметров в биологических жидкостях встречает определенные трудности и ограничения. С увеличением количества эпидемиологических программ, посвященных изучению

атеросклероза, в которых определение уровня холестерина крови является доминирующим, возникла необходимость выполнять анализы не только в стационаре, но и в поликлиниках, непосредственно у постели больного дома или же в условиях массовых эпидемиологических исследований.

Например, по данным ВОЗ, около 8% всех болезней в развитых странах связаны с повышенным уровнем холестерина в крови. Эту зависимость подтвердило недавно проведенное исследование EUROASPIRE I cohort [3]. Так, при общем холестерине менее 5 ммоль/л смертность от сердечно-сосудистых заболеваний — 4,8% (42/875), при уровне 5,4–5,5 ммоль/л — 4,2% (25/599), 5,5–6,4 ммоль/л — 5,5% (44/803), более 6,5 ммоль/л — 5,6% (20/357). В настоящее время имеются данные, что у населения России средний уровень холестерина составляет 6 ммоль/л, а в США — 4,9 ммоль/л.

Сложность регулярного контроля этих и других биохимических показателей связана с особенностями инвазивного забора материала. При этом надо учесть болезненность при извлечении крови, возможность инфицирования и, наконец, даже опасность заражения СПИДом. Все это существенно уменьшает возможности определения уровня холестерина крови и, что особенно важно, повторного динамического контроля для оценки эффективности лечебных и профилактических мероприятий. Это ограничивает мотивацию к при-

менению мощного профилактического и лечебного воздействия препаратов из группы статинов. Так, в настоящее время в России статины применяют только 0,6% людей, перенесших один инфаркт миокарда. В то же время в Индии принимают статины 5% пациентов, а в США — более 50%, и 80% лиц, у которых повышен уровень холестерина.

Интерес к *неинвазивным* методам диагностики особенно усилился в последние годы, о чем свидетельствуют и международные конференции, посвященные проблемам распознавания атеросклероза, сахарного диабета, онкологических заболеваний.

Работы в этом направлении много лет ведутся в НИИ физико-химической медицины (Москва), где под руководством академика РАМН Ю. М. Лопухина разработаны методы определения тканевого холестерина в эпидермисе. При этом на кожу наносится дозированное количество ферментосодержащей смеси, после чего оценивают концентрацию холестерина в реакционном растворе [4]. Для определения холестерина кожи в условиях клиники на поверхность кожи с помощью герметизированной кюветы наносят ферментосодержащую смесь (буферный раствор холестериноксидазы и поверхностно-активные вещества), после чего определяют концентрацию холестерина по уровню перекиси водорода [5].

Для визуальной индикации холестерина на поверхности кожи предложены средства, содержащие детектирующие вещества (дигитонины и др.), которые инкубируют со сшивающим агентом и соединяют с визуализирующими веществами [5].

С целью неинвазивного забора материала для исследования нам представляется целесообразным использовать конденсат паров выдыхаемого воздуха. Предпосылкой для такого подхода послужили результаты ранее проведенных исследований [6–9].

Данный подход разрабатывается нами с 1979 г. [10], когда был описан способ неинвазивного исследования сурфактанта, который впоследствии нашел широкое применение [11–14]. Для реализации этого способа в последующем были предложены более совершенные конденсирующие устройства [15–21].

Исследование паров выдыхаемой влаги применялось для быстрого анализа коматозных состояний в виде дыхательной маски [22]. Избыток кетоновых тел в выдыхаемом воздухе при кетоанализе также изучался в других исследованиях [23].

Изучалось содержание в конденсате оксида азота для определения состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем [15], соотношение жирных кислот, а также изменение кислотно-щелочного равновесия во время физических нагрузок [22–27]. За последние годы появились работы, указывающие на высокую диагностическую ценность экспиратов. Так, при традиционном исследовании изменения в легких при ревматоидном артрите были обнаружены у 12,5% больных, а при исследовании физико-химических свойств экспиратов — у 59,0%, то есть в 4,7 раза чаще [19].

В работах В. А. Добрых была доказана возможность определения в конденсате нелетучих веществ [21, 28].

Крупномасштабное исследование конденсата было проведено С. В. Бестужевой, которая определила у здоровых и больных лиц содержание 36 биохимических показателей, включая аминокислотный состав, фракции липидов, продукты перекисного окисления, гормональный состав, ряд ферментов, глюкозу, калий, кальций, железо и др., а также изменения этих показателей при физической нагрузке и в возрастном аспекте [29].

Все эти данные явились предпосылкой для разработки неинвазивного способа определения уровня холестерина в организме. Мы понимаем, что возможно применение других конденсирующих устройств, в том числе выпускаемых промышленно, но все-таки приведем полученные нами данные как продолжение сделанного обзора.

Разработанный способ включает сбор конденсата выдыхаемого воздуха с последующим биохимическим исследованием конденсата. Сбор конденсата может быть проведен в различных устройствах, приведенных, например, в [26] или [27], для работы в стационарном режиме или в переносном варианте. При этом было применено простое устройство, которое обеспечивало достаточно полную конденсацию паров выдыхаемого воздуха. При свободном дыхании и при температуре на дне конденсатора  $-10^{\circ}\text{C}$  конденсируется в среднем 0,042 мл жидкости из 1 литра выдыхаемого воздуха. Мы использовали устройство, описанное ранее [27], с применением термоса, заполненного охлаждающей смесью, с помощью которой можно получить температуру от 0 до  $-21^{\circ}\text{C}$ . В процессе сбора конденсата пациент должен равномерно и свободно выдыхать воздух в систему с охлажденным сосудом, а вдох делать через нос. При температуре охлаждения около  $-10^{\circ}\text{C}$  сбор конденсата требует примерно 5–7 мин. Его проводят натощак после 12-часового голодания. Накануне исключается курение, употребление спиртных напитков, для мужчин — сексуальная активность. Чистка зубов допустима не менее чем за 40–60 мин до сбора конденсата. Пациент ополаскивает полость рта кипяченой водой и выдыхает воздух в течение 5–7 минут через загубник в трубку, помещенную в охладитель. Для дальнейшего анализа берут аликвоту конденсата. Извлекают липидную фракцию и определяют содержание общего холестерина известными методами. Перед сбором конденсата в стеклянную пробирку может быть помещен сорбент, который после завершения процесса сбора конденсата извлекают, высушивают и пересылают в центры унифицированной обработки, где материал извлекают из сорбента и подвергают анализу на содержание общего холестерина.

Обследованию подверглись 47 пациентов, у которых определялось содержание общего холестерина в крови и в конденсате выдыхаемого воздуха. Определение проводили методом сбора конденсата

выдыхаемого воздуха. В табл. 1 приведены данные пациентов с нормальным содержанием общего холестерина в крови 3,1–5,2 ммоль/л.

В табл. 2 приведены данные пациентов с погранично высоким уровнем общего холестерина в крови 5,2–6,8 ммоль/л.

В табл. 3 приведены данные пациентов с высоким уровнем холестерина в крови (свыше 6,8 ммоль/л).

Таблица 1

**Содержание общего холестерина в крови и конденсате выдыхаемого воздуха у пациентов с нормальным содержанием общего холестерина**

№ п/п	Общий холестерин (ммоль/л)	
	в крови	в конденсате выдыхаемого воздуха
1	3,1	0,028
2	3,6	0,048
3	3,8	0,040
4	4,2	0,052
5	4,3	0,050
6	4,4	0,052
7	4,6	0,050
8	4,7	0,038
9	4,8	0,052
10	4,8	0,056
11	4,9	0,039
12	4,9	0,052
13	4,9	0,052
14	4,9	0,054
15	4,9	0,058
16	5,1	0,062
17	5,2	0,048
18	5,2	0,054
19	5,2	0,054
20	5,2	0,060

Примечание. Коэффициент корреляции  $r=0,66$  при достоверности показателей  $p<0,01$ .

Из приведенных данных видно, что имеется достоверная корреляция между содержанием общего холестерина в конденсате выдыхаемого воздуха и содержанием общего холестерина в крови.

Ниже приводятся несколько примеров подобного определения.

Пример 1. Пациентка в возрасте 46 лет. Исключено курение, употребление спиртных напитков. Голодание в течение 14 часов. После дыхания в течение 7 мин было отобрано 0,2 мл конденсата, который разделяли в смеси хлороформметанола. Полученную липидную фракцию выпаривали и в сухом остатке определяли содержание общего холестерина по цветной реакции с уксусным ангидридом. Содержание общего холестерина в конденсате

Таблица 2

**Содержание общего холестерина в крови и конденсате выдыхаемого воздуха у пациентов со стандартным риском гиперхолестеринемии**

№ п/п	Общий холестерин (ммоль/л)	
	в крови	в конденсате выдыхаемого воздуха
1	5,5	0,060
2	5,7	0,060
3	5,9	0,062
4	6,0	0,062
5	6,2	0,068
6	6,2	0,069
7	6,2	0,084
8	6,4	0,070
9	6,6	0,072
10	6,6	0,084
11	6,6	0,084
12	6,8	0,084

Примечание. Коэффициент корреляции  $r=0,68$  при достоверности показателей  $p<0,01$ .

Таблица 3

**Содержание общего холестерина в крови и конденсате выдыхаемого воздуха у пациентов с высоким риском гиперхолестеринемии**

№ п/п	Общий холестерин (ммоль/л)	
	в крови	в конденсате выдыхаемого воздуха
1	7,2	0,092
2	7,2	0,098
3	7,2	0,103
4	7,4	0,094
5	7,4	0,100
6	7,4	0,112
7	7,6	0,064
8	7,7	0,076
9	7,7	0,096
10	7,7	0,098
11	7,7	0,123
12	8,7	0,110
13	8,7	0,128
14	9,2	0,142
15	9,4	0,158

Примечание. Коэффициент корреляции  $r=0,86$  при достоверности показателей  $p<0,01$ .

у пациентки составило около 0,040 ммоль/л, что свидетельствовало о нормальном значении этого метаболического фактора.

**Пример 2.** Обследована пациентка 58 лет. Отобрано 0,2 мл конденсата, после чего его наносили на фильтровальную бумагу и высушивали на воздухе. Полученный образец был направлен для унифицированной обработки. Непосредственно перед анализом образец обработан щелочью и выделена липидная фракция. Содержание общего холестерина в конденсате выдыхаемого воздуха составило 0,128 ммоль/л, что свидетельствовало о повышенном уровне холестерина и, следовательно, повышенной степени риска возникновения и развития атеросклероза.

**Пример 3.** Обследован пациент в возрасте 42 лет. Содержание общего холестерина в конденсате выдыхаемого воздуха составило 0,142 ммоль/л, что говорит о высокой степени метаболического риска.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что вполне реально получение важной информации о метаболическом факторе риска при неинвазивном методе сбора биологического материала [30].

Изучение конденсата выдыхаемого воздуха, начатое более четырех десятилетий назад, показало, что получение большого диапазона важной биохимической и физико-химической информации возможно сравнительно простым и доступным методом.

Актуальность подобного подхода подтверждается выходом соответствующего международного журнала (*Journal of Aerosol Medicine*), а также проведением международных конференций по этой тематике (*The International Society for Aerosols in Medicine*; *JSAM*).

Важно отметить многократно подтвержденную возможность оценивать динамику состояния

пациентов в ходе проводимого лечения и реабилитации.

Вероятно, в настоящее время назрела необходимость расширить использование данного метода сбора материала для популяционных, унифицированных исследований, при этом надо учесть возможность дистанционных унифицированных исследований, например, если в ходе планируемой всеобщей диспансеризации возникает необходимость охвата сельского населения.

Для повышения чувствительности при применении сорбентов можно проводить экспресс-анализ с применением нанопористого кремния в качестве активного элемента датчика благодаря большой площади его поверхности и чувствительности электронных свойств к окружающей среде. Нами был изучен именно этот вид датчика, описание которого приведено в отдельной публикации [31].

Представляется, что неинвазивный метод ждет своего применения в тех случаях, когда, контролируя динамику состояния, нежелательно причинять болевые ощущения, например в рамках спортивной медицины и допингового контроля. В свое время мы предложили данный метод сбора материала для контроля метаболизма в условиях космических полетов, когда неинвазивность забора материала особенно важна.

Главной задачей все же является расширение фронта метаболических исследований с целью выявления различных градаций атеросклеротического процесса, который развивается, по меткому выражению R. Lerich, «в угрюмой тишине наших тканей».

Выявление динамики показателей общего холестерина может обеспечить должную мотивацию для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

#### Литература

1. Сидоренко Г. И. Целенаправленная профилактика сердечно-сосудистых заболеваний: состояние и перспективы // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук.— 2008.— № 4.— С. 14–19.
2. Сидоренко Г. И. Принцип оптимальности и перспективы его использования в кардиологии // Кардиология СНГ.— 2003.— Т. 1.— № 1.
3. Predictive value of classical risk factors and control in coronary patients: a follow-up of the EUROASPIRE I cohort / D. De Basquer, G. De Basquer, E. Östör et al. // *Europ. J. Cardiovascular prevention rehab.*— 2003.— Vol. 10.— P. 298–296.
4. Пат. № 2130189. Российская Федерация, МПК G01N33/92. Способ определения тканевого холестерина кожи / Парфенов А. С., Лопухин Ю. М. — № 97102570/14; заявл. 20.02.97; опубл. 05.10.99.
5. А. с. № 1675770. Способ получения средств для визуальной индикации холестерина на поверхности кожи / Лопухин Ю. М., Андрианова И. П., Зуевский В. В., Рабовский А. Б. — Бюл. 1991. № 33.
6. Levey S., Balchum O.J. Studies of metabolic products in expires air / *J. Lab. and Clin. Med.*— 1963.— Vol. 62.— P. 247–254.
7. Larsson B. T. Gas chromatography of organic volatiles in human breath and saliva // *Acta Chem. Scandinav.*— 1965.— Vol. 19.— P. 159–164.
8. Jansson B. O., Larsson B. T. Analysis of organic compounds in human breath by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Lab. And Clin. Med.*— 1969.— Vol. 74.— P. 961–966.
9. Coukle J. P., Camp B. J., Welch B. E. Trace composition of human respiratory gas // *Arch. Environ. Health.*— 1975.— Vol. 30— P. 290–295.
10. А. с. 694180. Способ исследования субфактанта / Сидоренко Г. И., Зборовский Э. И., Бандарин В. А., Вдовичева Д. И.— Бюл. 1979, № 40.
11. Адо А. Д., Волкова Н. В., Червинская Т. А. Состояние поверхностно-активных свойств сурфактанта при бронхиальной астме // *Клин. мед.*— 1984.— № 4.— С. 41.
12. Добрых В. А. О происхождении нелетучих веществ выдыхаемого воздуха // *Физиология человека.*— 1987.— Т. 13.— № 6.— С. 1035–1037.

13. Левина Д. И. Взаимосвязь функции внешнего дыхания легких с их поверхностной активностью: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1984.— 18 с.
14. Камышиников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2-х т.— Т. 2.— Минск: Беларусь, 2002.— 463 с.
15. Пат. 2143689. Российская Федерация, МПК G01№33/497. Способ определения состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем на основе анализа оксида азота в выдыхаемом воздухе / Малышев И. Ю., Манухина Е. Б.— № 97102570/14; заявл. 20.02.97; опубл. 10.05.99, Бюл. 1999, № 36.
16. Майбогин А. М., Смирнов А. С. Исследование конденсата выдыхаемого воздуха для оценки повреждения легких, вызванного искусственной вентиляцией // Весці НАН Беларусі: Сер. мед. навук.— 2006.— № 3.— С. 83–85.
17. Reddy R. R., Chadha A., Bhattacharya E. Biosensor and bioelectronics.— 2001.— Vol. 16 (4–5).— P. 313–317.
18. Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications // Therapeutic Advances in Respiratory Disease.— 2007.— № 1.— P. 5–23.
19. Диагностика поражений легких больных ревматоидным артритом по физико-химическому состоянию экспиратов / М. В. Ермолаева, О. В. Синяченко, А. М. Белоконов, Я. М. Песин // Укр. пульм. журн.— 2006.— № 2.— С. 18–20.
20. Informative Data for pH of Exhaled Breath Condensate / A. O. Paget-Brown, I. Ngamtrakulpanit, A. Smith et al. // Chest.— 2006; 12 g.— P. 426–430.
21. Добрых В. А. К вопросу о выделении нелетучих веществ с выдыхаемым воздухом // Физиология человека.— 1984.— Т. 10.— С. 681–682.
22. А. с. 627820. Дыхательная маска / Сидоренко Г. И., Зборовский Э. И., Вдовичева Д. И.— Бюл. 1978, № 38.
23. Пат. 2117290. Российская Федерация, МПК G01№33/497. Способ дифференцированной диагностики заболеваний бронхолегочной системы / Хышиктуев Б. С., Хышиктуева Н. А., Иванов В. Н. .— № 95109305/14; заявл. 30.05.95; опубл. 10.08.98, Бюл. 1998. № 22.
24. Сидоренко Г. И., Зборовский Э. И. Дыхательный хемостат и его роль в регуляции рН по данным выдыхаемой жидкости // Механизмы повреждения, резистентности, адаптации и компенсации: Тез. докл. II Всесоюзного съезда патофизиологов.— Ташкент, 1976.—Т. 1.— с. 450.
25. Сидоренко Г. И., Зборовский Э. И., Левина Д. И. Атравматический метод исследования поверхностно-активных свойств легкого (сурфактанта): Метод. рекомед.— Минск: МЗ БССР, 1981.— 14 с.
26. Сидоренко Г. И., Зборовский Э. И., Левина Д. И. Поверхностно-активные свойства конденсата выдыхаемого воздуха (новый способ определения функции легких) // Терап. архив.— 1980.— № 3.— С. 65–68.
27. Новый подход к изучению сурфактантной активности легких / Г. И. Сидоренко, Э. И. Зборовский, С. В. Бестужева, Д. И. Левина // Регуляторно-приспособительные механизмы в норме и патологии.— Л., 1982.— С. 27–29.
28. Добрых В. А. О происхождении нелетучих веществ выдыхаемого воздуха // Физиология человека.— 1987.— Т. 11— С. 1035–1036.
29. Бестужева С. В. Аспекты энергетической адаптации и регуляторно-выделительной функции легких на этапе экспертизы и реабилитации.— Минск, 1997.— 239 с.
30. Пат. 33150 Беларусь, МПК 7851C2G01. Способ определения состояния сердечно-сосудистой системы / Сидоренко Г. И., Колядко М. Г., Золотухина С. Ф. и др.; заявл. 30.12.2001; опубл. 28.02.2006, Бюл. № 1 (ВУ).— 3 с.
31. О возможности определения холестерина плазмы крови, сорбированного нанопористым кремнием / Г. И. Сидоренко, Э. И. Тоцицкий, Г. А. Залеская и др.— Весці НАН Беларусі: Сер. мед. навук.— 2005.— № 2.— С. 5–9.

Поступила 27.11.2008