КОНФЕРЕНЦИЯ А

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И АТМОСФЕРНЫЕ РАДИАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ

ВОЗМОЖНОСТИ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ ЛЕТУЧИХ МЕТАБОЛИТОВ В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ

Кистенев Ю.В., Шаповалов А.В., Борисов А.В., Князькова А.И.

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Российская Федерация, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

E-mail: yuk@iao.ru, shpv@phys.tsu.ru, borisov@phys.tsu.ru, a_knyazkova@bk.ru

Ключевые слова: выдыхаемый воздух, лазерная оптико-акустическая спектроскопия, метод главных компонент, метод опорных векторов

Аннотация

В данной работе проведено исследование применимости оптико-акустического газоанализатора на основе параметрического генератора света со сверхширокой полосой перестройки для контроля вариаций профиля метаболитов в выдыхаемом воздухе при изменении положения тела испытуемого. С помощью метода главных компонент показано, что данный метод является достаточно чувствительным для реализации указанной задачи.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП ИР, контракт №14.578.21.0082 (уникальный идентификатор прикладных научных исследований и экспериментальных разработок RFMEFI57814X0082).

В современной медицине растет понимание того, что для исследования состояния человека наряду с геномом и протеомом необходимо учитывать его биохимический фенотип или метаболом. Метаболом представляет собой набор низкомолекулярных метаболитов (таких как промежуточные продукты обмена веществ, гормоны и другие сигнальные молекулы и вторичные метаболиты). Метаболиты – это промежуточные и конечные продукты обмена веществ. В метаболомике метаболиты обычно определяют как любые молекулы размера не более 1 КДа [1].

Метаболиты, являясь промежуточными соединениями биохимических реакций, играют важную роль в объединении различных биохимических путей, функционирующих в живой клетке. Уровень метаболитов зависит от активности ферментов, катализирующих их превращение. В свою очередь, концентрация и свойства ферментов – это сложная функция различных регуляторных процессов, включающих регулирование транскрипции и трансляции, регуляции белок-белковых взаимодействий, и аллостерической регуляции активности ферментов путем их взаимодействия с метаболитами. Метаболом – это биохимический фенотип организма, который является заключительным результатом взаимодействия генотипа с окружающей средой. В отличие от генома, транскриптома и протеома, метаболом непосредственно связан с биологическими функциями организма [2].

В работе [3] представлен справочник по летучим органическим веществам (ЛОВ), содержащимся в выдыхаемом воздухе (872 ЛОВ), слюне (359 ЛОВ), крови (154 ЛОВ), молоке (256 ЛОВ), кожных выделений (532 ЛОВ) моче (279 ЛОВ), фекалиях (381 ЛОВ) у здоровых людей. Анализ авторов показал, что лишь 12 ЛОВ (0,7% от всего количества) присутствует во всех субстанциях: ацетальдегид, 2-пропанон (ацетон), бензальдегид, 1-бутанол, 2-бутанон, гексанал, гептанал, октанал, пентанол, бензол, стирол, толуол. Семь из них обладают карбонильной группой, последние три соединения являются производными от веществ, содержащихся в табачном дыме, а также характерны для загрязняющих окружающую среду веществ в городских районах, наряду с бензолом и алкилбензолом, толуолом.

Подобный справочник ЛОВ, присутствующих в выделениях здоровых людей, полезен для понимания метаболических путей, является важным шагом для диагностики заболеваний на основе контроля ЛОВ в различных биопробах, в частности, в выдыхаемом воздухе. Потенциальными достоинствами подобных методов диагностики является неинвазивность, простота использования, минимальная стоимость исследования, пригодность для непрерывного мониторинга. Ряд компонент выдыхаемого воздуха тесно коррелирует с их концентраций в сосудах, что устраняет необходимость забора крови для анализа [4], при этом анализ выдыхаемого воздуха не требует предварительной подготовки пробы, в отличие от исследования состава крови или мочи.

При проведении диагностических тестов необходимо учитывать, что на относительно медленно меняющиеся метаболические процессы, связанные с воспалительными реакциями, может накладываться биохимический отклик организма на изменение внешних условий или физическую нагрузку.

Например, в работе [5] показано, что при выполнении физической нагрузки вследствие возникающего окислительного стресса содержание кетонов (гептанон-2, гептанон-3), фенола и идентифицированных альдегидов (деценаль, октадеценаль) и ацетола в выдыхаемом воздухе достоверно снижалось, что связано, по-видимому, с преобладанием альтернативного - метилглиоксалевого пути метаболизма углеводов. Таким образом, динамика концентраций насыщенных углеводородов в выдыхаемом воздухе может быть показателем реакции организма на окислительный стресс, а уровень ацетола - индикатором тренированности человека, адекватности физических нагрузок, и как показатель развития гипоксических состояний [6].

Авторами [7] проведено исследование в реальном времени состава выдыхаемого при изменении положения тела здоровых добровольцев методом реакции переноса протона с масс-спектрометрией (PTR-MS). Добровольцы выполняли два упражнения с различными последовательностями изменений положения тела. Первая последовательность изменений

положения тела: сидя, стоя, лежа и сидя. Вторая: лежа на спине, лежа на левом боку, лежа на правом боку, лежа на животе, лежа на спине. Каждая позиция сохранялась в течение двух минут. Установлено, что в первом упражнении, по отношению к положению «сидя» концентрация изопрена, фурана и ацетона в выдыхаемом воздухе увеличилась на 24%, 26%, 9%, соответственно; в положении «стоя» рост составил 63%, 36%, 10%, соответственно. Во втором упражнении по отношению к начальному положению «лежа на спине» концентрации изопрена, фурана в выдыхаемом воздухе увеличились на 29%, 16%, соответственно, в положении «лежа на правом боку» и далее «лежа на животе». Отмечается, что в последних положениях снижается ударный объем крови, в то время как причины наблюдаемых изменений должны быть связаны с отношением вентиляции/перфузии, а не только одной перфузии.

Сравнение методов анализа метаболитов в выдыхаемом воздухе [8] (таблица 1) показывает, что методы лазерной спектроскопии обладают достаточно оптимальным набором параметров и представляют высокий практический интерес для исследования профиля маркеров в выдыхаемом воздухе.

В первом столбце таблицы 1 написаны масс-спектрометрии: SIFT-MC – ионо-проточная масс-спектрометрия, PTR-MC – масс-спектрометрия с реакцией переноса протонов, GC-MS – газовая хроматографическая масс-спектрометрия с термической десорбцией или твердо-фазной микроэкстракцией SPME, LAS – лазерно-абсорбционная спектроскопия, IMS - масс-спектрометрия подвижных ионов.

Таблица 1 - Сравнение характеристик методов исследования

Аналитический метод	Режим работы	Предел обнаружения	Чувствительность	Специфичность
SIFT-MS	Прямой/ в реальном времени	ppbv	высокая	высокая
PTR-MS	Прямой/ в реальном времени	pptv	высокая	средне-высокая
IMS	В реальном времени	ppbv	средняя	средняя
GC-MS	С использованием предварительного концентрирования пробы	pptv-ppbv	Очень высокая	Очень высокая
LAS	В реальном времени	ppbv	высокая	Высокая
Sensor arrays	С использованием базы эталонов	ppbv	средняя	средняя

В данной работе анализируются возможности оптико-акустического газоанализатора на основе параметрического генератора света со сверхширокой полосой перестройки для мониторинга динамики профиля летучих метаболитов в выдыхаемом воздухе. Исследование спектров осуществлялось с помощью лазерного оптико-акустического газоанализатора (ЛОАГ)

«ЛазерБРИЗ», разработанного фирмой ООО «Специальные технологии» (г. Новосибирск). Данный газоанализатор предназначен для регистрации состава газовых проб с применением широкополосного параметрического генератора света (диапазон перестройки 2500нм-10500нм) и оптико-акустического детектора.

В проведенном исследовании группа добровольцев в составе 10 человек выполняли следующую последовательность изменений положения тела: лежа, сидя, стоя, физическая нагрузка (бег), по 10 мин в каждом состоянии. Забор проб осуществлялся в конце каждой стадии упражнения.

Экспериментальные данные по каждой пробе выдыхаемого воздуха (ПВВ) включали данные: о длине волны λ_i^s, относительном коэффициенте поглощении α_i^s; техническом параметре контроля pk_i^s, характеризующем ошибку прибора для каждого значения длины волны.

Используемый в данном исследовании газоанализатор обеспечивает перестройку длины волны источника излучения с неравномерным шагом по длине волны, поэтому все полученные спектры приводились к равномерной шкале по длине волны в соответствии со следующей формулой:

$$\lambda_i = \exp\left(\frac{\lambda_i^s - \lambda_{\min}^s}{\lambda_{\max}^s - \lambda_{\min}^s} \log(h_{\max}) \right).$$

Здесь λ_i - значение длины волны на равномерной шкале, λ_i^s, $\lambda_{\max}^s$, $\lambda_{\min}^s$ - любое, максимальное и минимальное значения длины волны для спектра с наибольшим диапазоном длин волн, $h_{\max}$ - максимальное значение шага в спектре, отнесенное к единице длины с наибольшим диапазоном длин волн. В данной работе $\lambda_{\max}^s$=2500нм, $\lambda_{\min}^s$=10500нм, $h_{\max}$=25.

Для каждого спектра поглощения ПВВ α_i^s и технического параметра контроля pk_i^s в диапазоне $\Delta\lambda_i = \lambda_{i+1} - \lambda_i$ осуществлялось усреднение. Все значения в интервалах $\Delta\lambda_i$ с параметром контроля $pk_i^s < 0.01$ исключались из дальнейшего рассмотрения. Пример экспериментального спектра показан на рисунке 1.

Для анализа данных использован метод главных компонент (МГК). Применение МГК к анализу состава многокомпонентных газовых смесей представлено, например, в [9-10].

Для применения МГК введем матрицу данных $\mathbf{Z} = (\mathbf{Z}_1, ..., \mathbf{Z}_m)$, строки которой содержат спектры поглощения ПВВ, столбцы - коэффициенты поглощения на соответствующей длине волны.

Применение МГК к этой матрице предполагает ее представление в виде $Z = TP^t + E$. Здесь T – матрица счетов, P – матрица нагрузок, E – матрица погрешностей [11-12]. Столбцы матрицы $\mathbf{P} = (\mathbf{Y}_1, ..., \mathbf{Y}_L)$ содержат главные компоненты $\mathbf{Y}_j$, j=1,…,m.

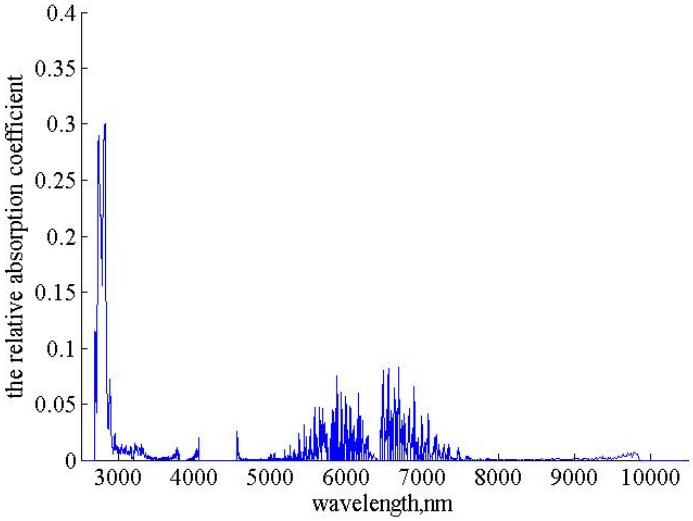
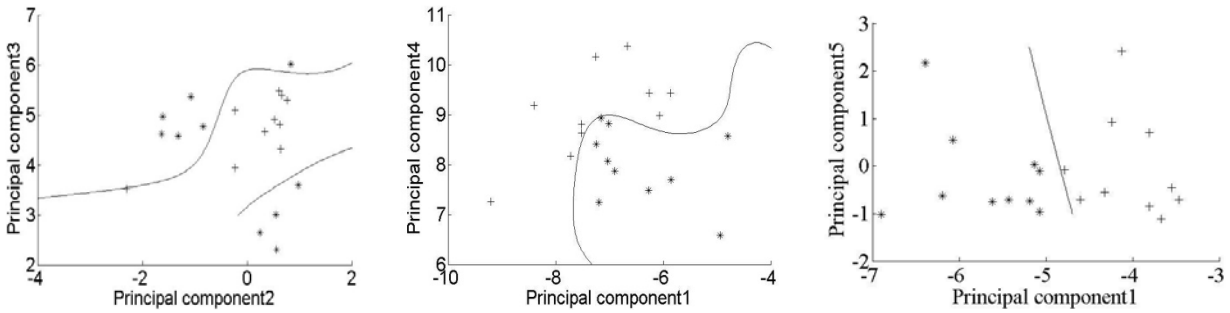


Рисунок 1 – Пример спектра поглощения ПВВ здорового добровольца с исключенными значениями относительного коэффициента поглощения из-за погрешности прибора

На рисунке 2 показаны проекции испытуемых в пространстве главных компонент на соответствующие плоскости в процессе выполнения выше указанной последовательности изменений положения тела. Видно, что группы объектов, соответствующие различным стадиям последовательности изменений положения тела пространственно разделяются.

Таким образом, представленные результаты показывают, что оптико-акустический газоанализатор на основе параметрического генератора света со сверхширокой полосой перестройки «ЛазерБРИЗ» позволяет проводить мониторинг динамики профиля летучих метаболитов в выдыхаемом воздухе, аналогично тому, как это сделано в работе [7].

Информация, заложенная в спектрах поглощения выдыхаемого воздуха (ПВВ), позволяет не только фиксировать различия состава выдыхаемого воздуха в зависимости от положения тела, но и, применяя методы интеллектуального анализа данных, выделять соответствующие метаболиты [9-10].



а б в

Рисунок 2 – Проекции испытуемых в пространстве главных компонент на указанные на рисунке плоскости в процессе выполнения последовательности изменений положения тела: лежа, сидя, стоя, физическая нагрузка (бег). Здесь, на рисунке а) - участники в положении «лежа» обозначены «*»,в положении «сидя» - «+»; на рисунке б) - участники в положении «сидя» обозначены «*», в положении «стоя» - «+»; на рисунке в) - участники в положении «стоя» обозначены «*», в положении «бег» - «+».

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП ИР, контракт №14.578.21.0082 (уникальный идентификатор прикладных научных исследований и экспериментальных разработок RFMEFI57814X0082).

Литература

1. Ellis, D.I. and Goodacre, R. (2006) Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. Analyst 131, 875—885. DOI:10.1039/b602376m

2. Ellis, D.I., Dunn, W.B., Griffin, J.L., Allwood, J.W. and Goodacre, R. (2007) Metabolic Fingerprinting as a Diagnostic Tool. Pharmacogenomics, 8(9), 1243—1266.

3. Amann A., Al-Kateb H., Flynn C., Filipiak W., Khalid T, Osborne D, Ratcliffe N. M. Costello B de L. A review of the volatiles from the healthy human body //. — №8. — 2014. — P. 014001 (29 pp.).

4. Cao W. Breath Analysis: Potential for Clinical Diagnosis and Exposure Assessment // Clinical Chemistry. — №52., 5. — 2006. — P. 800-811.

5. Sukul P1, Trefz P, Kamysek S, Schubert JK, Miekisch W. Instant effects of changing body positions on compositions of exhaled breath // J Breath Res. 2015 Nov 19;9(4):047105. doi: 10.1088/1752-7155/9/4/047105.

6. Марданов Р.Г., Орлов О.И., Маркин А.А., Царьков Д.С., Мухамедиева Л.Н. Исследование молекулярных маркеров окислительного стресса в выдыхаемом воздухе здорового человека // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2010, т. 44, № 6 год: с 44-48.

7. Pritam Sukul, Phillip Trefz, Svend Kamysek, Jochen K Schubert and Wolfram Miekisch. Instant effects of changing body positions onto compositions of exhaled breath//JOURNAL OF BREATH RESEARCH 2015.

8. Lourenço, C., Turner, C., “Breath Analysis in Disease Diagnosis: Methodological Considerations and Applications,” Metabolites 4, 465-498 (2014).

9. Yu. V. Kistenev ; A. V. Borisov ; A. V. Shapovalov, Determination of component concentrations in models of exhaled air samples using principal component analysis and canonical correlation analysis // Proc. SPIE 9810, XII International Conference on Atomic and Molecular Pulsed Lasers, 98101Z (December 15, 2015); doi:10.1117/12.2225575.

10. Yu.V. Kistenev; A.V. Shapovalov; A.V. Borisov ; D.A. Vrazhnov; V.V. Nikolaev; O. Y. Nikiforova, Applications of principal component analysis to breath air absorption spectra profiles classification // Proc. SPIE 9810, XII International Conference on Atomic and Molecular Pulsed Lasers, 98101Y (December 15, 2015); doi:10.1117/12.2225565.

11. Jackson J.E. A user’s guide to principal components — s.l.: N.Y.: John Wiley, 1991. — 592 с.

12. Jolliffe I.T. Principal Component Analysis; 2d — s.l.: Springer NY, 2002. — 487 с.