

Л.В.Капилевич, Е.Ю.Дьякова, А.В.Носарев, К.В.Давлетьярова, Ю.В.Кистенев, Л.М.Огородова,
Ю.Н.Пономарев, Б.Г.Агеев, И.В.Ковалев, М.Б.Баскаков, М.А.Медведев

Спектральный анализ состава выдыхаемого воздуха в условиях формирования гиперреактивности воздухоносных путей

ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, г. Томск;
НИИ оптики атмосферы СО РАН, г. Томск

L.V.Kapilevich, E.Yu.Dyakova, A.V.Nosarev, K.V.Davletyarova, Yu.V.Kistenev, L.M.Ogorodova, Yu.N.Ponomarev,
B.G.Ageev, I.V.Kovalev, M.B.Baskakov, M.A.Medvedev

Spectral analysis of exhaled air under airway hyperreactivity development

Summary

Exhaled air gases were investigated in experimental animals using intraresonator laser acousto-optic sensor ILPA-1 and methane detector before and after sensitization with ovalbumin. Absorption lines typical for CO₂ and NH₃ were found in exhaled air of intact guinea pigs. After the challenge inhalation, absorption coefficients for CO₂ and NH₃ decreased and absorption lines for N₂O and NO₂ occurred. Methane flow decreased after sensitization. Reduction in CO₂ concentration could be due to lowering gas exchange between the alveolar air and the blood because of breathing disorders. Ammonium having alkaline properties can bind and precipitate bronchial secret due to pH shift to acidic media. N₂O and NO₂ are products of NO metabolism and could occur because of enhanced nitric oxide production by inducible NO-synthase. Methane flow reduction is thought to be due to inhibition of airway microflora.

Резюме

С помощью внутрирезонаторного лазерного оптико-акустического сенсора ILPA-1 и детектора метана был исследован газовый состав выдыхаемого воздуха (ВВ) у экспериментальных животных до и после сенсibilизации овальбумином. В ВВ интактных морских свинок были обнаружены линии поглощения, соответствующие газам CO₂ и NH₃. После провокационной ингаляции исследование состава выдыхаемого воздуха выявило уменьшение коэффициентов поглощения для CO₂ и NH₃ и появление линий поглощения N₂O и NO₂. Величина потока метана после сенсibilизации была снижена. Снижение содержания CO₂ можно объяснить уменьшением газообмена между альвеолярным воздухом и кровью вследствие расстройства дыхания. Аммиак, имеющий щелочную природу, может связываться и осажаться в бронхиальном секрете из-за сдвига pH среды в кислую сторону. N₂O и NO₂ являются продуктами метаболизма NO, их появление может быть обусловлено увеличением продукции оксида азота индуцибельной NO-синтазой. Уменьшение величины потока метана может быть связано с угнетением микрофлоры воздухоносных путей.

Для успешного лечения заболеваний органов дыхания необходима корректная постановка диагноза на ранних этапах. При этом на первый план выходят неинвазивные методы диагностики, которые могут применяться в скрининговых исследованиях. Широко используются лабораторно-функциональные методы исследования биохимических, биофизических, иммунологических показателей. Несомненно, особый интерес в этом отношении представляет изучение выдыхаемого воздуха (ВВ). ВВ — это среда, которая отражает варианты биохимической индивидуальности в норме и при патологии [1]. На сегодняшний день в выдыхаемом человеком воздухе удалось идентифицировать более 100 химических соединений. Составы ВВ и крови взаимосвязаны, что позволяет в ряде случаев отказаться от исследований крови и оценивать пробы воздуха. Диагностические возможности данного метода подтверждаются и тем, что концентрации бронхоальвеолярных

веществ в ВВ и легочной ткани изменяются однонаправленно [2].

Актуальной представляется разработка новых методов исследования газового состава выдыхаемого воздуха, необходимым этапом которой являются экспериментальные исследования. Чтобы выявить изменения в содержании газовых маркеров при заболеваниях легочной системы, моделируют дисфункцию респираторного тракта у экспериментальных животных. Цель настоящего исследования — изучение спектрального состава выдыхаемого воздуха у экспериментальных животных при сенсibilизации овальбумином.

Методика исследования

В работе использовались экспериментальные животные — половозрелые морские свинки-самцы (18 особей, масса — 200–300 г). Гиперреактивность

воздухоносных путей формировалась посредством sensibilizации овальбумином, которая проводилась по методике, предложенной *Каллосом* и *Пэйджлом* [4]. Животные sensibilizировались трехкратно подкожными инъекциями 0,1 мл на 100 г массы тела 0,25%-ным (масса / объем) раствором овальбумина в физиологическом растворе (промежуток между инъекциями — 3–4 дня). На 21-й день животные подвергались ингаляционному воздействию аэрозоля того же раствора с помощью ультразвукового небулайзера "Муссон-1М" (ОАО "Алтайский приборостроительный завод "Ротор", г. Барнаул, Россия), размер дисперсных частиц — до 5 мкм.

Газовый состав ВВ животных определялся до sensibilizации и сразу после провокационной ингаляции. Исследование проводилось на внутрирезонаторном лазерном оптико-акустическом сенсоре ILPA-1 (ЗАО "ЭльСиЭс Фасилити Менеджмент", г. Новосибирск, Россия). Животное помещалось в стеклянную камеру объемом 0,03 м³ с плотно закрывающейся крышкой на 7 мин, после чего из камеры производился забор пробы воздуха.

Принцип действия сенсора основан на оптико-акустическом эффекте, возникающем в результате поглощения газами излучения CO₂ лазера в спектральном диапазоне 9,2–10,8 мкм. Резонансный дифференциальный оптико-акустический детектор (ОАД) проточного типа установлен внутри резонатора CO₂ лазера. С помощью зонда, присоединенного к штуцеру, бралась проба воздуха из стеклянной камеры, где находилось экспериментальное животное, и воздушным насосом прокачивалась через ОАД. Молекулы газа, имеющего линии поглощения на длине волны излучения CO₂ лазера, поглощали модулированное излучение CO₂ лазера, при этом внутри ОАД формировались акустические колебания, которые регистрировались микрофонами. Величина измеренного акустического сигнала (коэффициент поглощения, выраженный в произвольных единицах, — *arbitrary unit*, или *a. u.*) пропорциональна концентрации молекул поглощающего газа в пробе воздуха. Информация о величине зарегистрированного сигнала отображается на мониторе блока управления и в виде индикации спектра поглощения [3].

Полученные в результате проведенных измерений спектры поглощения сравнивались с уже известными спектрами различных веществ [9]. Для изучения содержания метана в выдыхаемом воздухе на детекторе метана животное также помещалось в стеклянную камеру объемом 0,03 м³ с плотно закрывающейся крышкой, в которую были вмонтированы 2 трубки: 1-я сообщалась с атмосферой, а 2-я — с насосом, прокачивающий забираемую пробу через кювету детектора. Детектор метана (НИИ общей физики РАН, Москва) предназначен для измерения концентрации метана методом регистрации оптической плотности с помощью диодного лазера одной из его линий поглощения в ближней ИК-области. Излучение диодного лазера происходит в 2 противо-

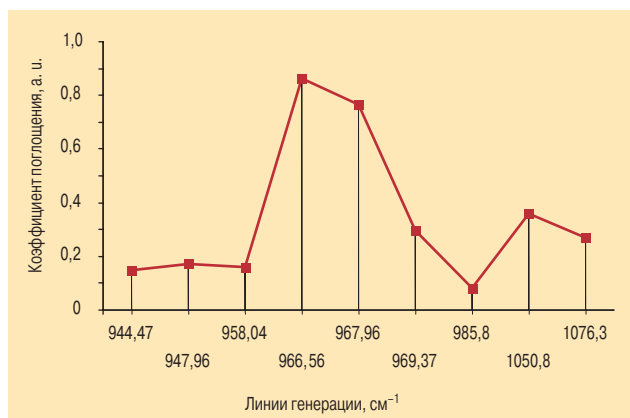


Рис. 1. Коэффициент поглощения газов в выдыхаемом воздухе в группе интактных животных

положных направлениях. В одном из них лазер излучается в перестраиваемую многопроходную оптическую кювету, на выходе которой расположен фотоприемник; этот канал называется аналитическим. В другом направлении лазер дважды проходит через закрытую реперную кювету (заполненную метаном определенной концентрации) и попадает на другой фотоприемник; этот канал называется реперным. Метод определения концентрации метана основан на вычислении корреляционной функции формы сигналов в аналитическом и реперном каналах. Это позволяет достигнуть высокой селективности прибора по отношению к другим газам [5].

При сравнении показателей до и после формирования гиперреактивности воздухоносных путей использовался непараметрический ранговый Т-критерий Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

В 1-й серии экспериментов изучался газовый состав ВВ у интактных животных ($n = 18$). Было выявлено несколько линий поглощения (рис. 1), соответствующих следующим газам: CO₂ (2 линии в области 10 мкм) и NH₃ (3 линии в области 10 мкм). Также

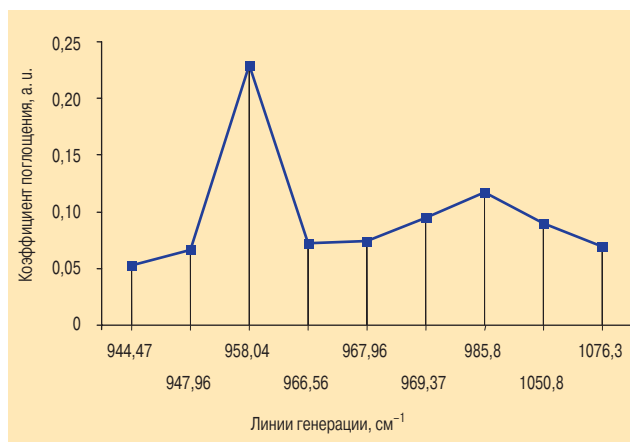


Рис. 2. Коэффициенты поглощения газов в выдыхаемом воздухе у животных после sensibilizации

были получены линии поглощения для углекислого газа и аммиака в области 9 мкм.

В следующей серии экспериментов были проанализированы данные газового состава ВВ у животных после сенсibilизации ($n = 18$). Были получены линии поглощения метаболитов NO: N_2O и NO^2 в области 10 мкм (рис. 2). При этом отмечалось уменьшение коэффициентов поглощения для CO_2 и NH_3 .

При сравнительном анализе коэффициентов поглощения в исследуемых группах были выявлены достоверные различия. На длине волны 10,59 мкм, 10,55 мкм и 9,52 мкм наиболее высокие значения коэффициента поглощения наблюдались в контрольной группе (0,1486; 0,1702 и 0,3576 *а. и. соответственно*). Эти длины волн соответствуют CO_2 . Следовательно, содержание CO_2 в ВВ у интактных животных значительно выше по сравнению с животными после сенсibilизации. Это можно объяснить тем, что во время приступа бронхиальной астмы (БА) происходит расстройство дыхания вследствие спазма мышц бронхов, отека их слизистой оболочки и повышенной секреции слизи особыми железами бронхов, в связи с чем просвет бронхов значительно сужается и газообмен между альвеолярным воздухом и кровью уменьшается [7].

При сравнении значений коэффициента поглощения аммиака в исследуемых группах выявлены достоверно более низкие его значения коэффициента у животных после сенсibilизации. Можно предположить, что при развитии воспалительного процесса в дыхательных путях происходит изменение рН среды в кислую сторону. Аммиак, имеющий щелочную природу, может связываться и осажаться в бронхиальном секрете, в связи с этим его содержание в ВВ может уменьшаться.

В то же время у животных после сенсibilизации отмечалось достоверное увеличение коэффициентов поглощения, соответствующие длине волны 10,44 мкм и 10,14 мкм. Эти показатели соответствуют линиям поглощения метаболитов оксида азота N_2O и NO^2 (рис. 2). Известно, что при БА экспрессируется ин-

дуцибельная NO-синтаза (NOS) и на порядок увеличивается продукция NO [5, 8]. Но так как NO быстро распадается, в ВВ можно зарегистрировать только его метаболиты, образующиеся в результате окислительных и восстановительных реакций.

В 3-й серии экспериментов исследовали поток метана в выдыхаемом животными воздухе. При сравнительном анализе были выявлены достоверно более высокие значения величины потока у животных до сенсibilизации ($2,44 \times 10^{-8}$ кг/мин) по сравнению с животными после сенсibilизации ($1,13 \times 10^{-8}$ кг/мин), как показано на рис. 3. Можно предположить, что при сенсibilизации происходит угнетение микрофлоры воздухоносных путей, приводящее к снижению содержания метана в ВВ.

Заключение

При сенсibilизации морских свинок овалбумином изменяется газовый состав ВВ. Расстройства дыхания во время приступа БА ведут к уменьшению газообмена в легких, поэтому содержание углекислого газа снижается [7]. Также уменьшаются значения коэффициента поглощения аммиака после сенсibilизации, что может быть связано с развитием воспалительного процесса в дыхательных путях, изменением рН среды в кислую сторону и осадением щелочного аммиака в бронхиальном секрете.

После формирования гиперреактивности обнаруживается достоверное увеличение коэффициентов поглощения метаболитов NO — N_2O и NO^2 . Усиление продукции NO при БА объясняется повышением активности индуцибельной NOS [5, 8]. Но так как NO быстро вступает в реакции, в ВВ через несколько секунд можно зарегистрировать только его метаболиты.

При сравнении потоков метана в ВВ у животных до сенсibilизации выявляются достоверно более высокие значения величины потока. Так как метан выделяется метанообразующими бактериями, а при БА происходит угнетение микрофлоры воздухоносных путей, это может приводить к снижению содержания метана в ВВ.

Таким образом, при сенсibilизации у морских свинок в ВВ снижается содержание CO_2 , аммиака и метана, но при этом повышается содержание метаболитов NO, что является следствием воспалительного процесса воздухоносных путей при бронхоспастических состояниях.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям, контракт № 02.438.11.7018.

Литература

1. Харитонов С.А., Барнс П.Дж., Чучалин А.Г. и др. Выдыхаемый оксид азота: новый тест в оценке функции легких. Пульмонология 1997; 3: 7–13.

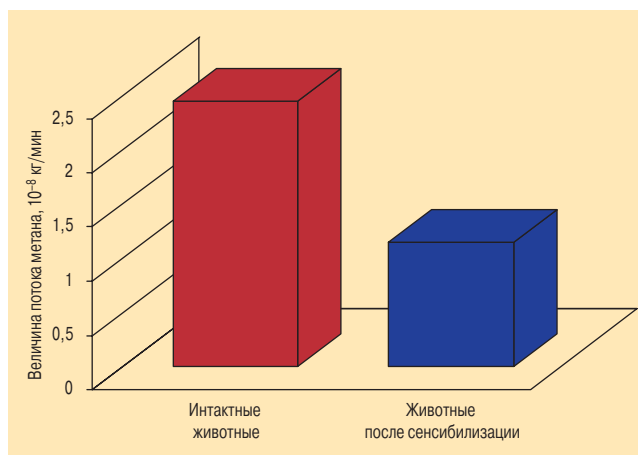


Рис. 2. Коэффициенты поглощения газов в выдыхаемом воздухе у животных после сенсibilизации

2. Невзорова В.А., Гельцер Б.И. Окись азота и геморегуляция легких. Пульмонология 1997; 2: 80–85.
3. Руководство по эксплуатации "Внутрирезонаторный лазерный оптико-акустический сенсор ILPA-1". Новосибирск: ЗАО "ЭльСиЭс Фасилити Менеджмент"; 2006.
4. Саркисов Д.С., Ремезов П.И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте. М.; 1960.
5. Сосунов А. А. Оксид азота как межклеточный посредник. Соросовский образоват. журн. 2000; 6 (12): 27–34.
6. Детектор метана на основе диодного лазера ближнего ИК-диапазона и многопроходной кюветы: Тех. описание. М.: General Physics Institute Natural Science Center; 2006.
7. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма. М.: Медицина; 1997.
8. Lazarus S.C. Just say NO: nitric oxide and its role in allergic disease. Astma Immunol.: 56th Ann. Meeting; 2000: 1058–1064.
9. Zuev V.V., Mitsel A.A., Plashnik I.V., Firsov K.M. Simulation of gas analysis of the atmosphere by long path method: Computer Code LPM. Computers in Physics 1995; 9 (6): 649–656.

Поступила 21.02.07

© Коллектив авторов, 2007

УДК 616.233-056.3-07:616.24-008.7-074