

# Metoda analýzy kondenzátu vydechovaného vzduchu v pracovním lékařství



<sup>1</sup>PELCLOVÁ D, <sup>1</sup>FENCLOVÁ Z, <sup>1</sup>VLČKOVÁ Š, <sup>1</sup>LEBEDOVÁ J, <sup>1</sup>KLUSÁČKOVÁ P,  
<sup>3</sup>SYSLOVÁ K, <sup>2</sup>NAVRÁTIL T, <sup>4</sup>KUZMA M, <sup>3</sup>KAČER P

<sup>1</sup>Univerzita Karlova v Praze, 1. LF, klinika pracovního lékařství 1. LF UK a VFN

<sup>2</sup>Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Praha

<sup>3</sup>Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

<sup>4</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

# Analýza biomarkerů ve vydechovaném vzduchu

- bouřlivý rozvoj
- přínosná pro **neinvazivní diagnostiku** aktivity onemocnění respiračního systému, z nichž pro některá neexistují jiné markery (pneumokoniózy).
- u onemocnění, vznikajících v důsledku senzibilizace na alergeny v životním i pracovním prostředí, vyznačujícími se zvýšenou koncentrací leukotrienů v kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV) se začínají využívat dokonce **pro hodnocení efektu léčení**.

# Analýza biomarkerů ve vydechovaném vzduchu

- 3 METODY
- Kondenzát vydechovaného vzduchu
- FeNO – vydechovaný oxid dusnatý
- Electronic nose (E-nose – Cyranose)



# Reaktivní formy kyslíku hrají významnou roli v patogenezi silikózy a azbestózy

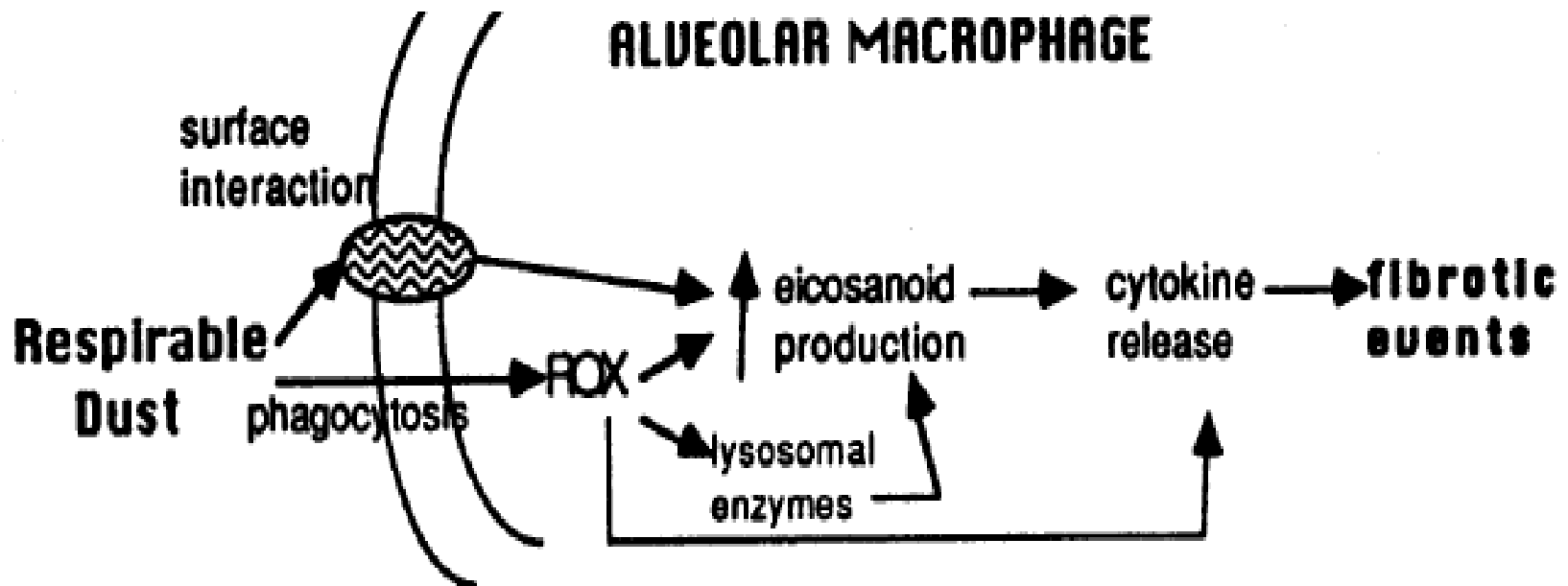
**Částice  $\text{SiO}_2$**

hydroxylový radikál OH.  
reaguje s Fe  
(Haber-Weissova reakce)

**Azbestová vlákna**

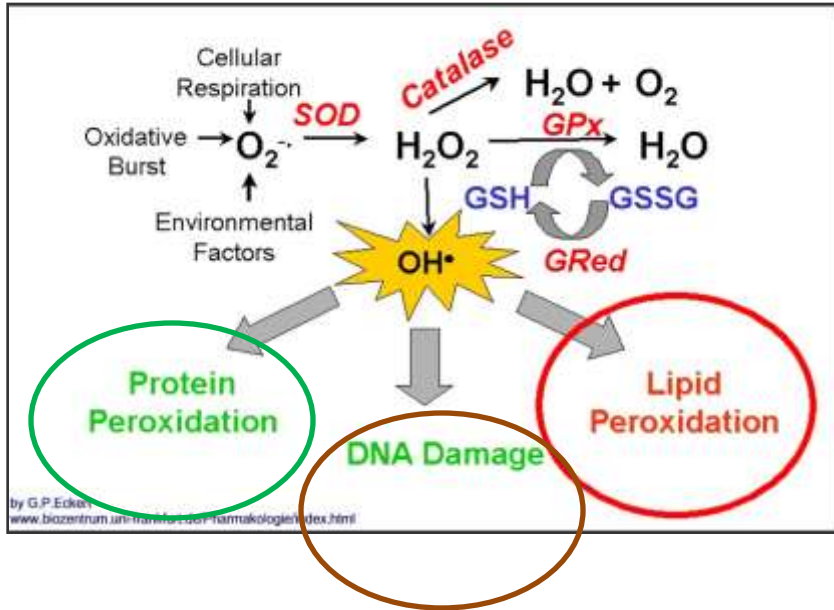
Demers and Kuhn, *Environ Health Perspect* 1994

Fubini B *Free Rad Biol Med* 2003

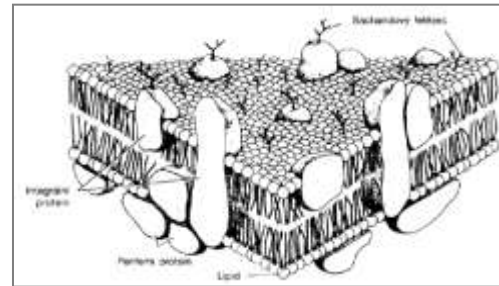


# OXIDACE

## proteinů, nukleových kyselin a lipidů



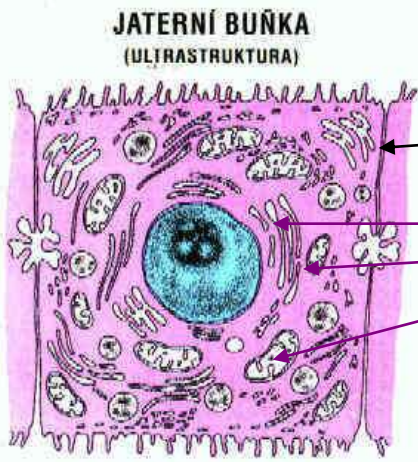
## Peroxidace lipidů buněčných membrán



Reaktivní formy kyslíku odtrhnou atom vodíku z nenasycených mastných kyselin (např. **arachidonové**) a iniciují peroxidaci in vivo.

# Membrány buňky – “tekutá mozaika“

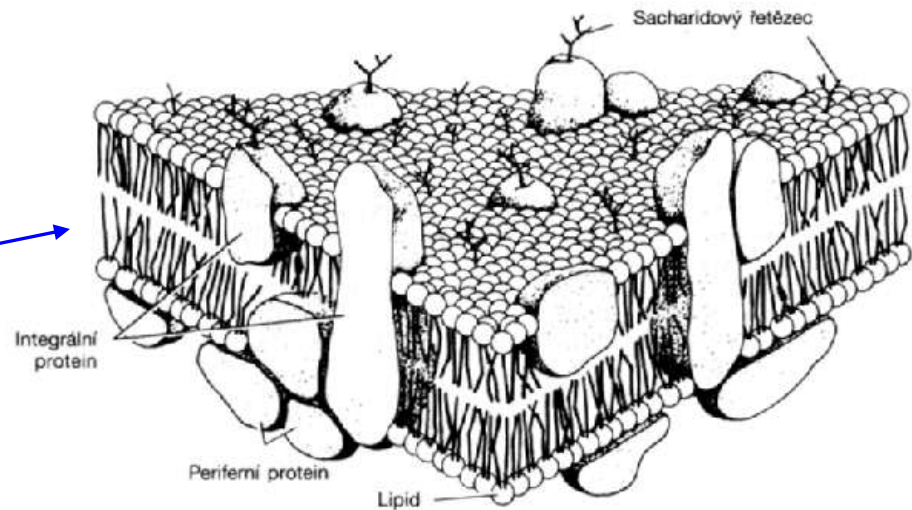
lipidová dvojvrstva z fosfolipidů, proteiny, cukry



Cytoplazmatická membrána buňky

Vnitřní membrány organel buňky

Lipidová dvojvrstva  
z fosfolipidů  
(mastné kyseliny)

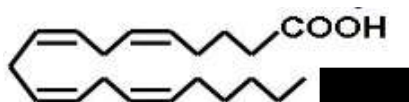


# Oxidace lipidů membrán - přímá



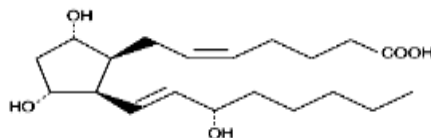
nenasycené mastné kyseliny buněčných membrán

Arachidonová kys.



*přímá oxidace ROS*

izoprostany (8-izoprostan)

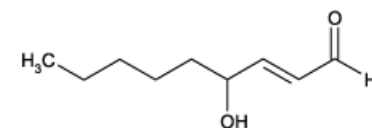


hydroxy-*trans*-2-nonenal (HNE)

(ROS)

malondialdehyd (MDA)

aldehdy (MDA, HNE)

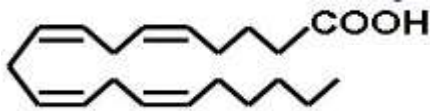


# Oxidace membránových lipidů - enzymatická



mastné kyseliny buněčných membrán

Kys. arachidonová



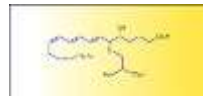
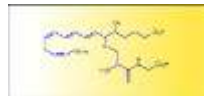
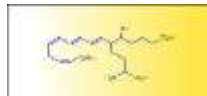
*lipoxygenáza*

**leukotrieny** (3 dvojně vazby)

**LTB<sub>4</sub>**

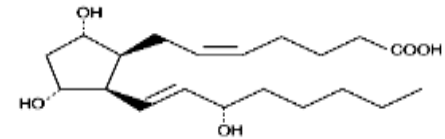


**cysteinylové - LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>**



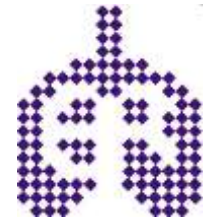
*přímá oxidace kyslíkovými radikály*

izoprostany (8-izoprostan)

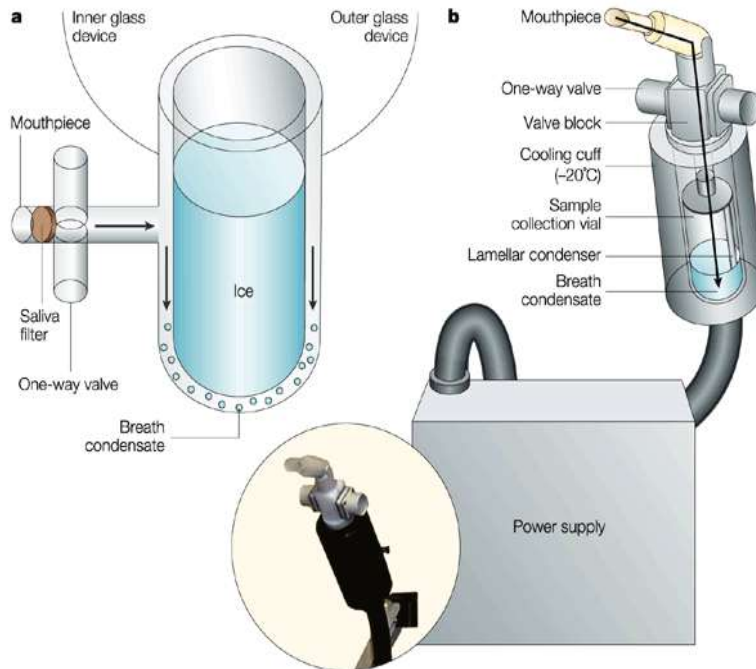




# Odběr kondenzátu vydech. vzduchu (KVV)



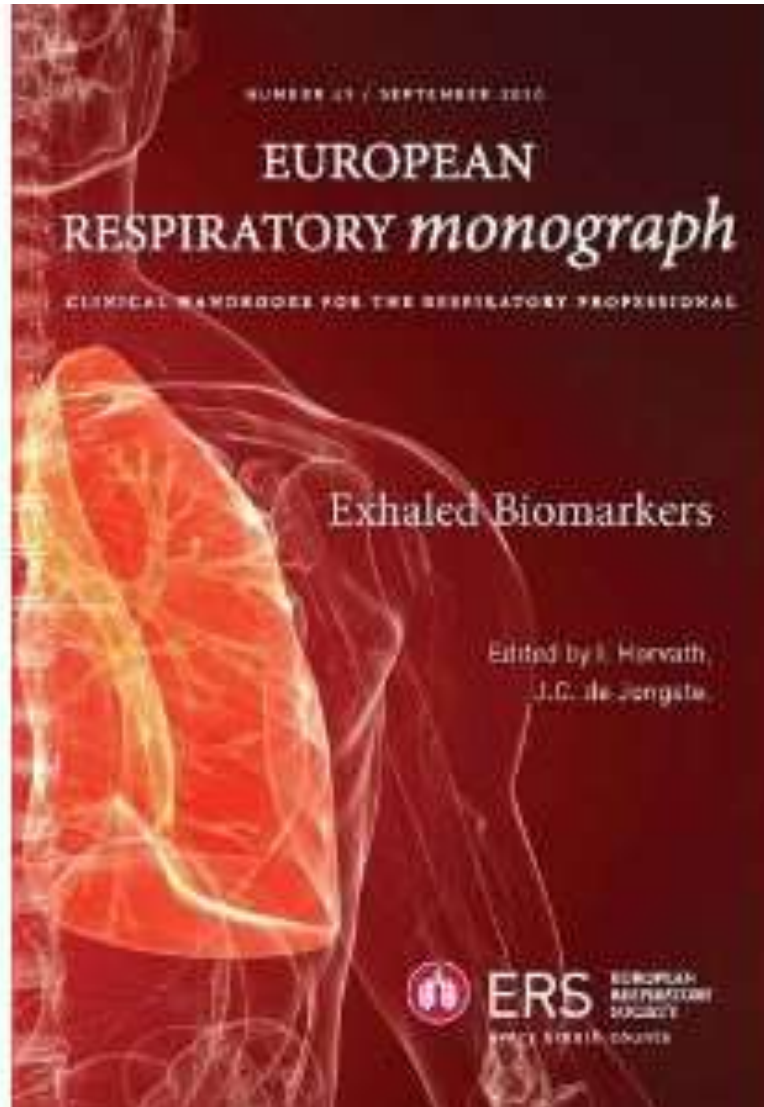
System pro neinvazivní sběr substancí z respiračního systému po kondenzaci zchlazením na  $-10^{\circ}\text{C}$  (Jaeger).



## KVV obsahuje:

- 1) kondenzovanou vodní páru,
- 2) **částice aerosolu tekutiny z dýchacích cest** uvolněné turbulentním proudem
- 3) ve vodě rozpustné látky.

# Metodika *Horvath et al. 2010*



# Odběr kondenzátu vydech. vzduchu (KVV)



**Byla analyzována řada mediátorů, včetně**  
izoprostanů, leukotrienů, aldehydů, oxidů  
dusíku,  
peroxidu vodíku, peptidů a cytokinů.

**Koncentrace těchto mediátorů jsou ovlivněny**  
**nemocemi respiračního systému.**

# Indikátory oxidačního stresu u interstic. plic. nemocí

- Zvýšená koncentrace izoprostanů u osob s plicními fibrózami v BALu (*Montuschi 1998*)
- v kondenzátu vydech. vzduchu (*Psathakis 2006*)



# Pneumokoniózy

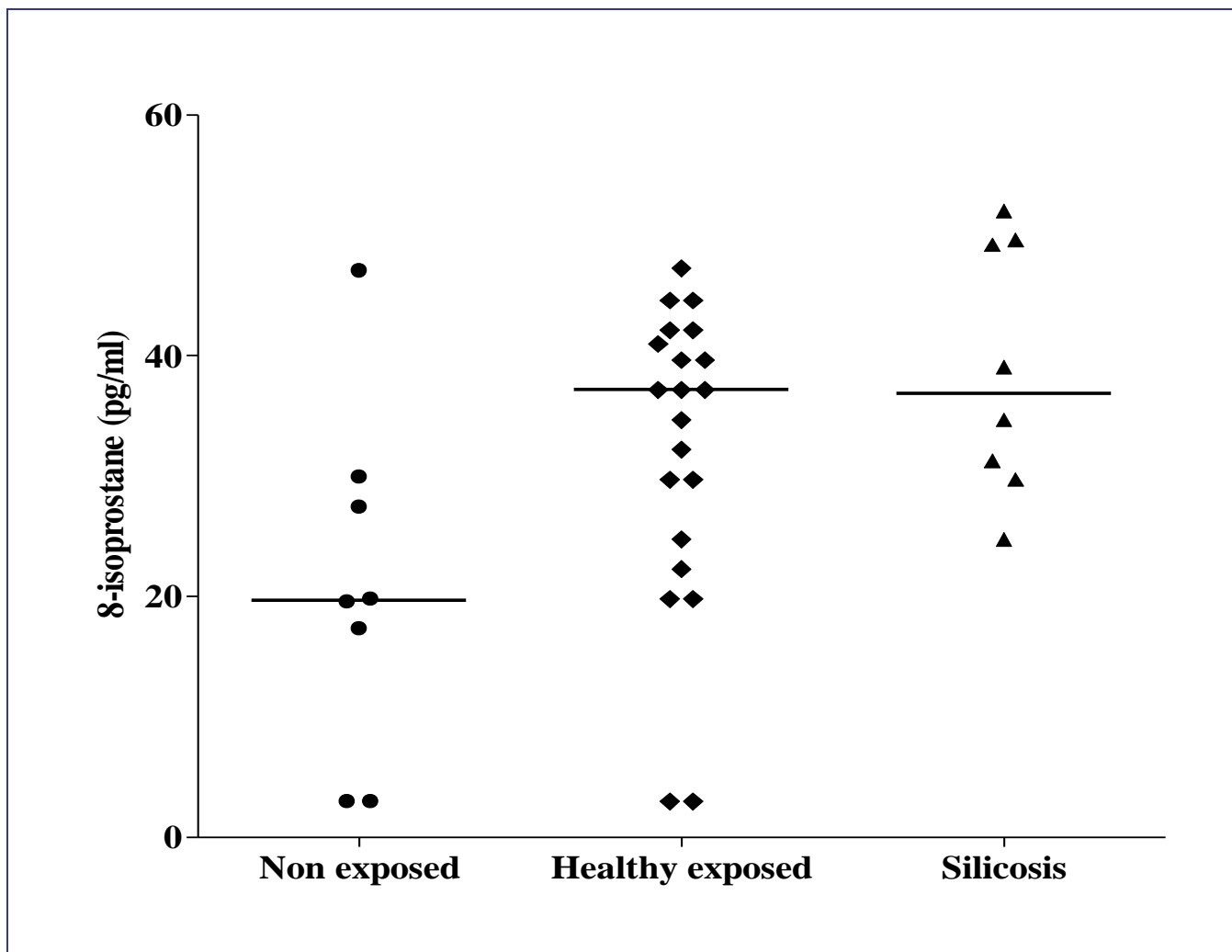


- V minulých letech jsme prokázali vyšší koncentraci 8-izoprostanu u pacientů se silikózou a azbestózou
- ***Pelclová D et al. Industrial Health 2007, 2008***
- také leukotrienů (LTE4 a LTD4).
- V kondenzátu vydechovaného vzduchu jsou hodnoty markerů významně vyšší proti zdravým vrstevníkům, než hodnoty stejných markerů v krvi a moči:
- ***Pelclová D et al. Industrial Health 2012***



# Nicola Murgia, Paolo Montuschi

*Section of Occupational Medicine, Respiratory Diseases  
and Toxicology, University of Perugia, Itálie*



# Výhody kondenzátu

- + neinvazivní vyšetření
- + lze libovolně opakovat - nemá žádný vliv na dýchací cesty
- + děti, starší, nemocní lidé

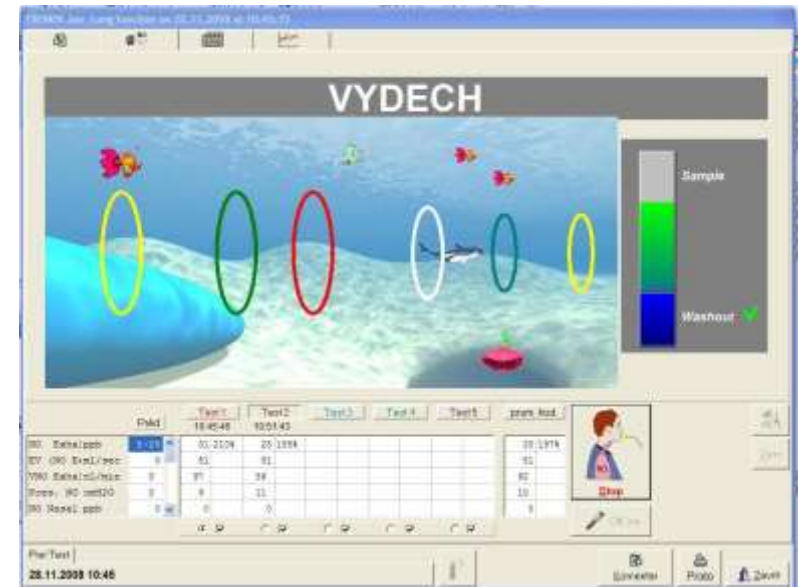
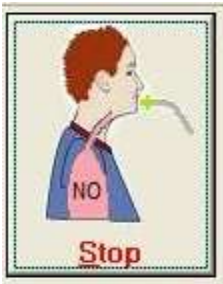
# Nevýhody kondenzátu

- cena laboratorní analýzy vzorku LC-ESI-MS/MS
- nejde zatím o standardní metodu
- problém s hodnocením koncentrace



# Měření vydechovaného oxidu dusnatého FeNO (fraction of exhaled NO)

- Metoda: JIŽ STANDARDNÍ
- Odpovídá standardům ERS / ATS
- Jednoduché, rychlé a neinvazivní vyšetření





# Metody



**20 dělníků s expozicí prachu s obsahem nanočástic:**  
muži, 34 let, 11 kuřáků, 9 nekuřáků  
před směnou  
po směně

**19 „zdravých“ dobrovolníků**  
muži, 35 let, 11 nekuřáků, 8 kuřáků  
jednou

**spirometrie**  
**moč chemicky**  
**anamnéza, TK, P, orientační interní vyšetření**



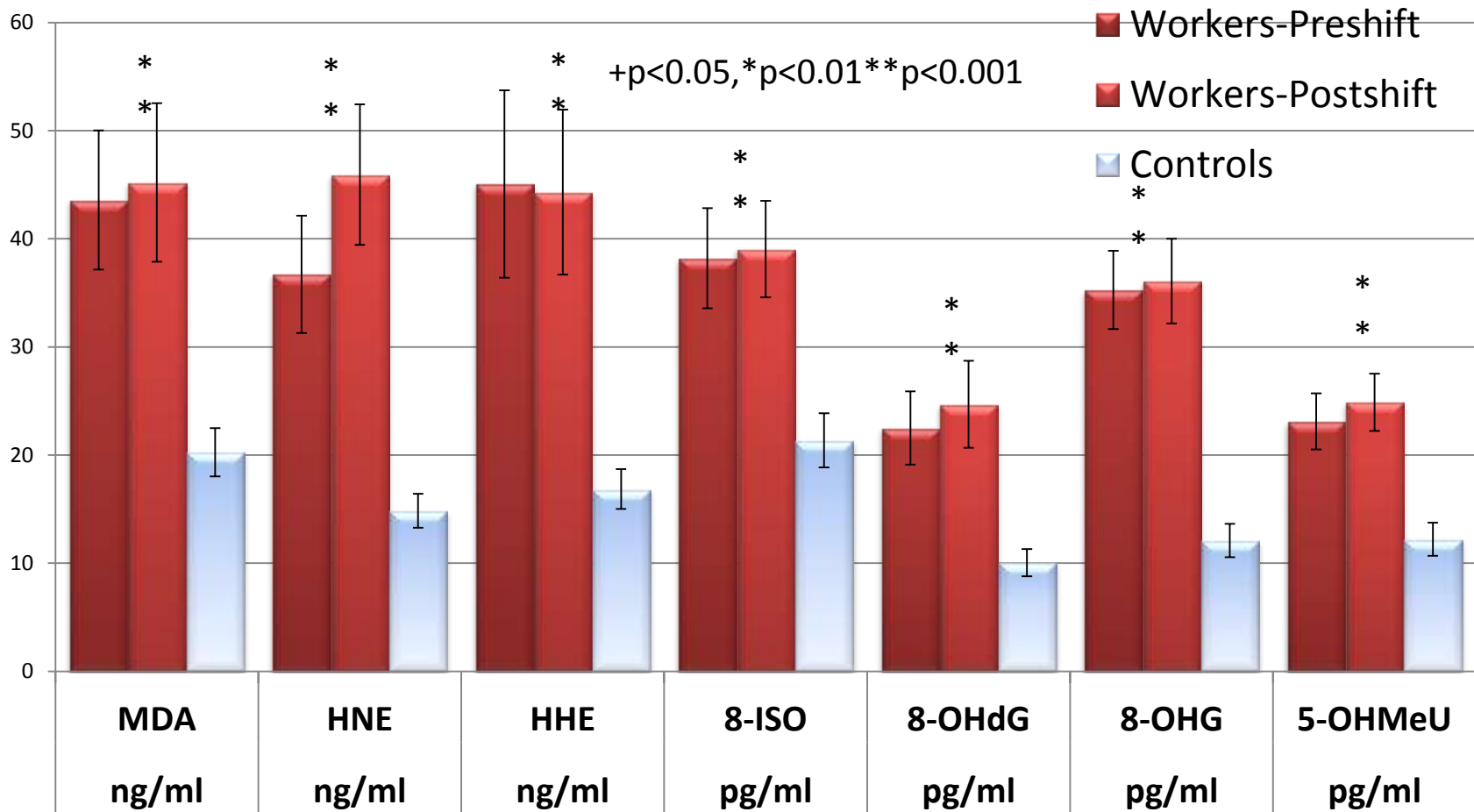
# Měřené markery v kondenzátu vydech. vzduchu a moči



- malondialdehyd (MDA),
- 4-hydroxy-trans-nonenal (HNE),
- 4-hydroxy-trans-hexenae (HHE),
- 8-isoProstaglandin  $F_{2\alpha}$  (8-isoprostan),
- 8-hydroxy-2-deoxyguanosin (8-OHdG),
- 8-hydroxyguanosine (8-OHG),
- hydroxymethyl uracil (HMeU),
- o-tyrosin (o-Tyr),
- 3-chloro-tyrosin (3-Cl-Tyr),
- nitrotyrosin (NO-Tyr)
- leukotrieny LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>
  
- FeNO

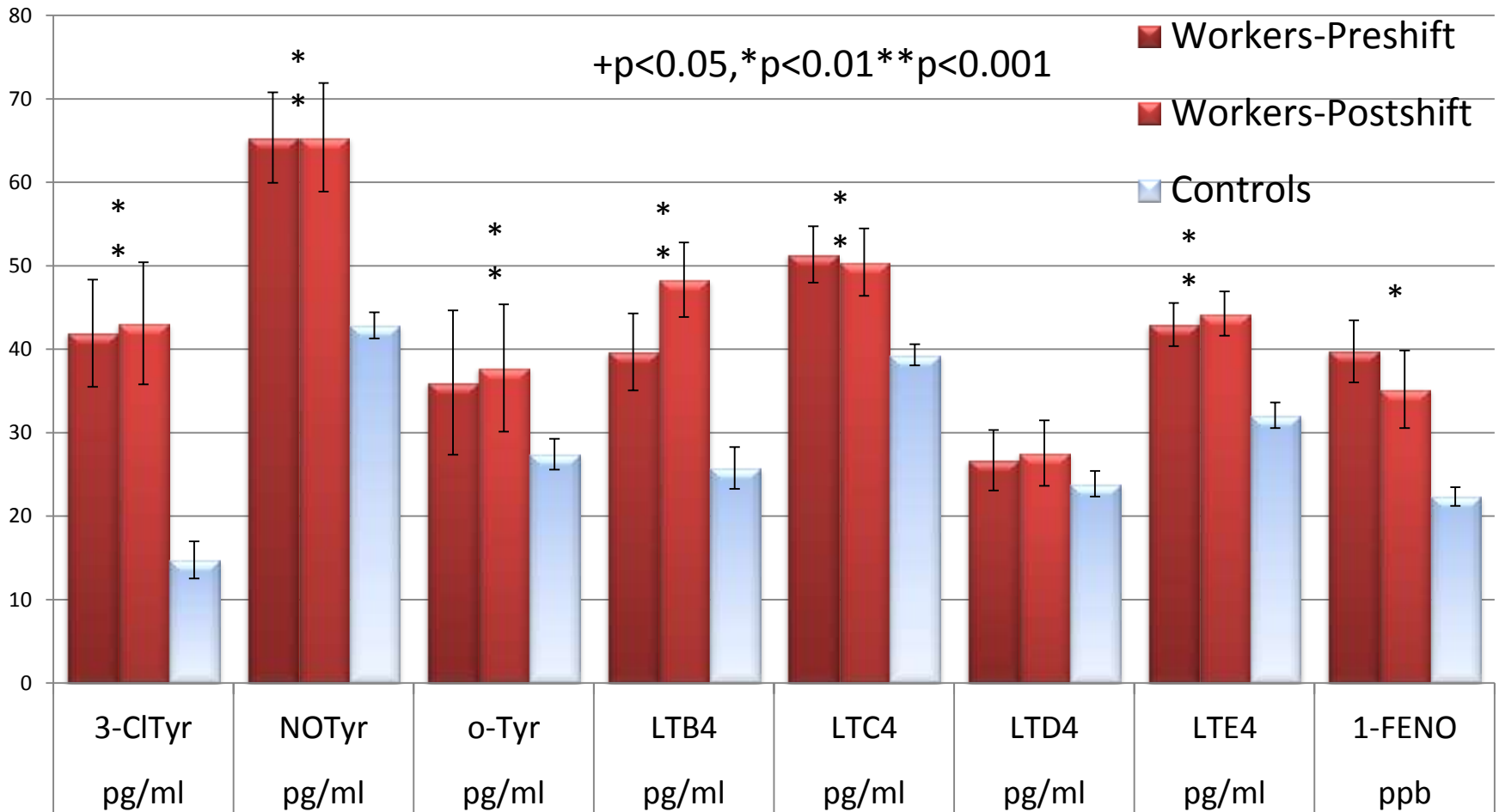


# Produkty oxidace lipidů a nukl. kyselin v KVV u dělníků (před a po směně, kontrolní osoby)



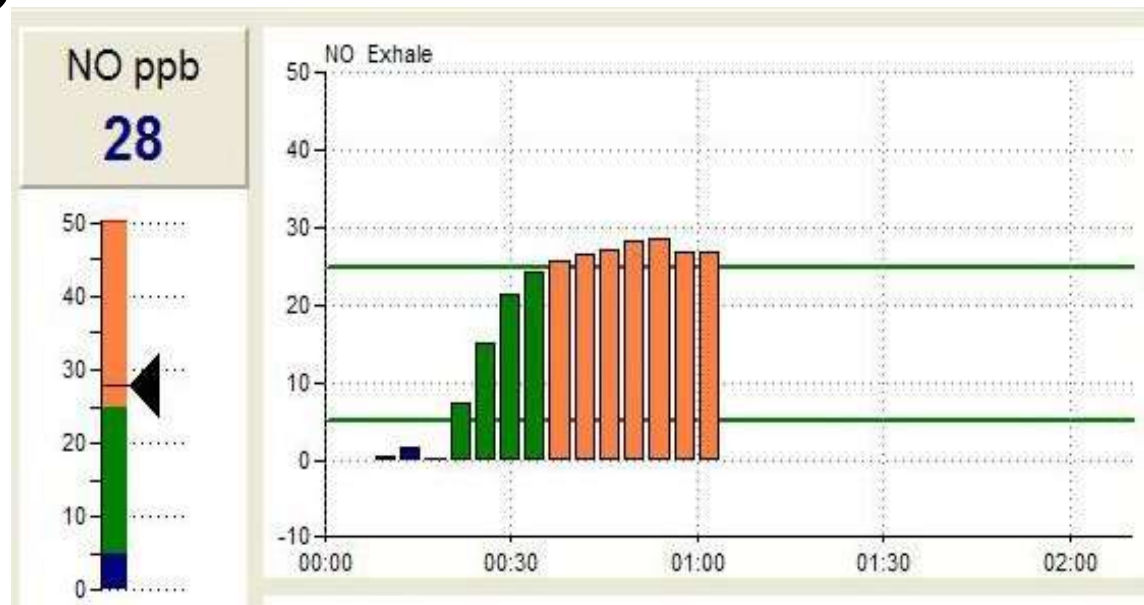


# Produkty oxidace proteinů a leukotrieny v KVV u dělníků (před a po směně, kontrolní osoby)



# Výsledky FeNO

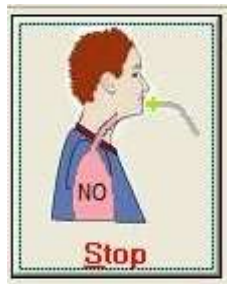
FeNO	ppb
Před směnou	39.8±8.5*
Po směně	35.2±8.1*
Kontroly	22.4±7.5



Vydechovaný NO	Možná diagnostická interpretace
<20	Nepravděpodobný zánět
20-35	Možnost mírného zánětu
35-50	Signifikantní nález zánětu
>50	Signifikantní nález zánětu s doporučením zahájit léčbu inhalačními nebo orálními steroidy

- **Faktory zvyšující FeNO**

- Zadržování dechu
- Jídlo a pití
- Zánět horních cest dýchacích
- Astma
- Namáhavá činnost
- Zánět dolních cest dýchacích
- Atopie

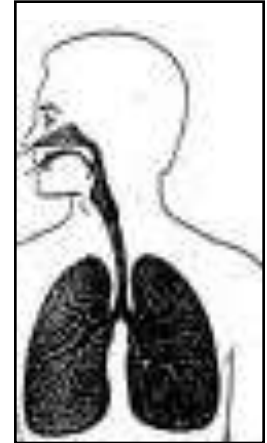


- **Faktory snižující FeNO**

- Vysoká průtoková rychlost výdechu
- Inhalační nebo orální gluko-kortikostereoidy
- **Kouření**
- Alkohol
- Cystická fibrosa
- CHOPN

- **31 ppb dělníci kuřáci**
- **45 ppb dělníci nekuřáci**

# OTÁZKY KOLEM METODIKY KVV



- Nejde o standardní klinickou metodu
- 2 teoretické problémy –
- 1) nelze přesně odlišit, odkud pochází odebíraná tekutina z kapiček kapaliny lemující epitel dých. cest (epitelial lining fluid): plicní sklípky – dých. cesty – nosohltan – nos – ústní dutina?
- pro vyloučení kontaminace z horních dýchacích cest měření alfa-amylázy (ze slin)



# OTÁZKY KOLEM METODIKY KVV



- 2) Jsou koncentrace hodnověrné?
- Obsah markerů v KVV skutečně odráží změny, probíhající v tekutině
  - (*Effros et al J Appl Physiol 2005*)
  - **diluční indikátory** – kationty Na,K,Ca,Mg), močovina v KVV a plazmě – plní roli jako kreatinin v moči
  - jejich hodnoty korelovaly s plazmou –
  - u zdravých lidí i pacientů
  - měření konduktivity tekutiny



# Výsledky

- PŘED SMĚNOU I PO SMĚNĚ SE MEZI SEBOU VÝZNAMNĚ NELIŠILY
- U DĚLNÍKŮ byly v **KVV** významně zvýšeny v **obou obdobích všechny markery kromě LTD4**
- Rovněž byl významně zvýšen **FeNO** u dělníků
- V moči byl zvýšen jen HHE, 8-OHG, 3-CITyr, naopak u kontrol LTC4 a LTD4



# CO S TÍM?

- VÝSLEDKY JSOU PŘEDBĚŽNÉ
- Jde o první výsledky – nelze je srovnat, dosud podobná vyšetření nejsou k dispozici
- Malá skupina 20 osob
- Bude vyšetřena konduktivita KVV
- Mikroskopické vyšetření nanočástic
- Vhodné je zopakovat vyšetření

Děkuji za pozornost