

Analýza stopových látek v lidském dechu pro diagnostiku nemocí

Patrik Španěl

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR



Analýza stopových látek v lidském dechu pro diagnostiku nemocí.

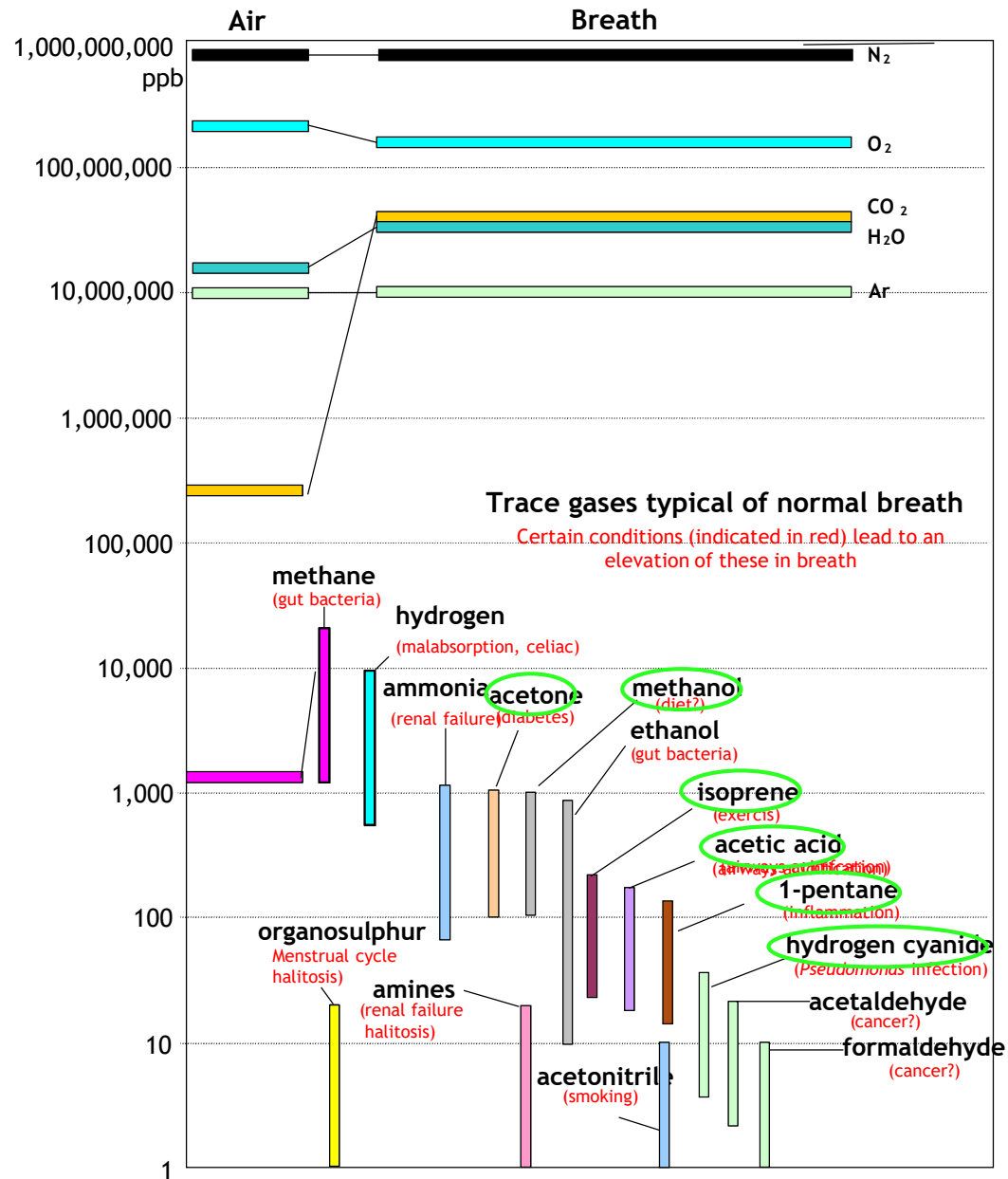
Už po staletí je známo, že některé choroby vedou k přítomnosti látek v lidském dechu, ale až donedávna neexistovaly jednoduché a objektivní metody, jak měřit jejich koncentrace. Přitom je naděje, že klinická diagnostika pomocí analýzy dechu by byla neinvazivní a poměrně rychlá, jak se již ukazuje v některých oborech, jako diagnostika astmatu nebo žaludečních infekcí.



Dech (životní síla) spojuje tělo, duši a ducha. Úkolem této životní síly je udržení dokonalé rovnováhy mezi elementy těla navzájem a mezi elementy těla a okolí.

Avicenna, Kánon medicíny (Al-Kánún fi ttibb), kolem 1030.

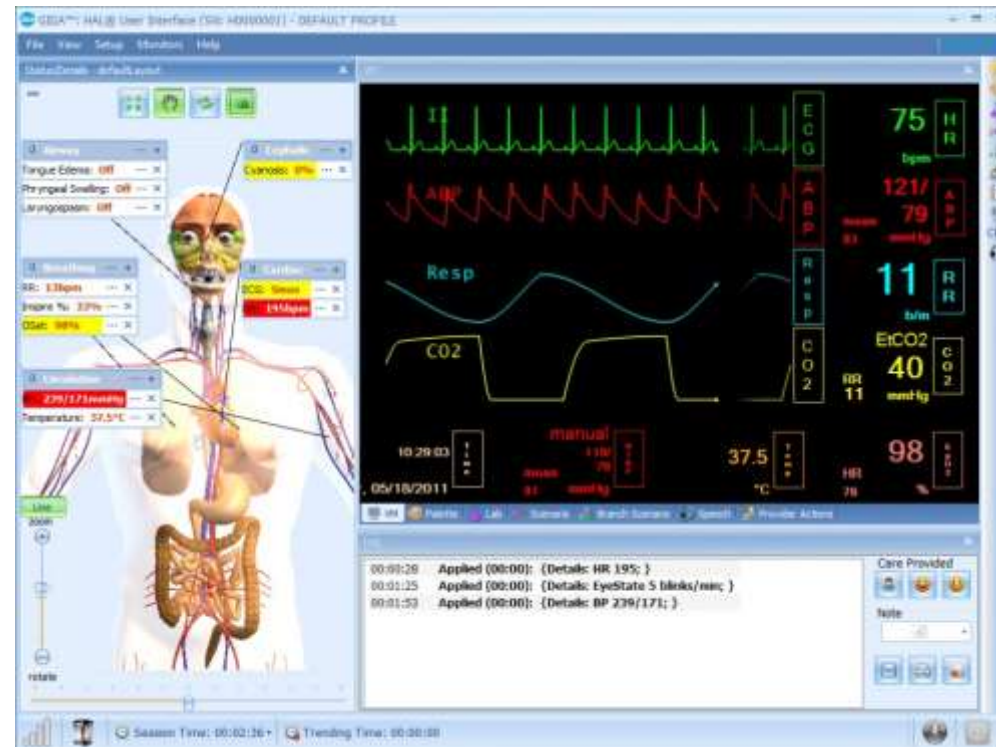
Složení vdechovaného a vydechovaného vzduchu



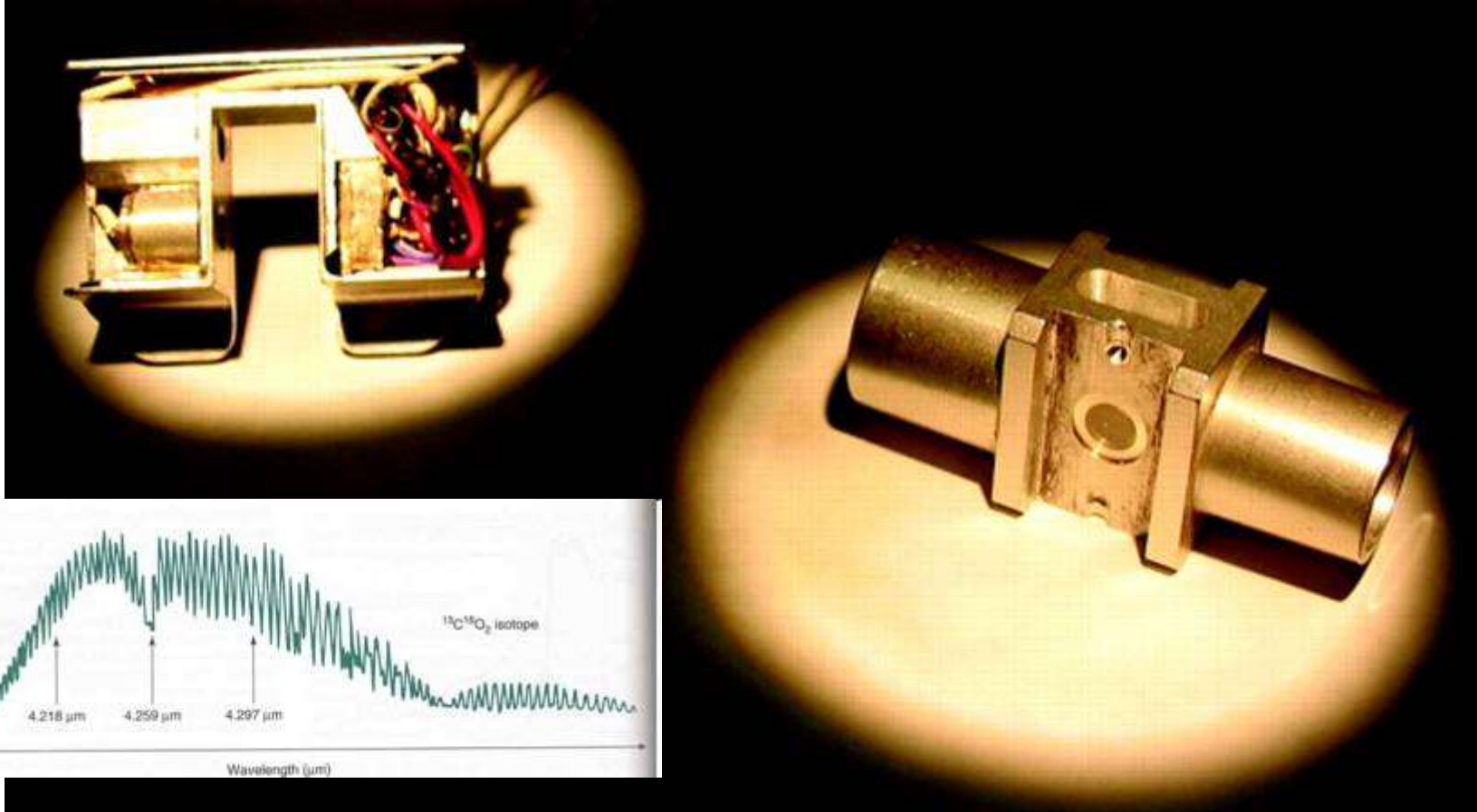
- N₂
- O₂
- CO₂
- H₂O
- Ar
- H₂
- CH₄
- CO
- NH₃
- (CH₃)₂CO
- CH₃OH
- C₂H₅OH
- C₅H₈
-

Kapnografie

- ▶ Metoda grafického záznamu obsahu oxidu uhličitého během určitého časového úseku. Srov. kapnometrie kapno-; -grafie.
- ▶ Ověří správnost ventilace při operacích



Original prototype Capnostat CO₂ sensor and airway adapter (Image courtesy of Respironics, Inc., Murrysville, PA.).

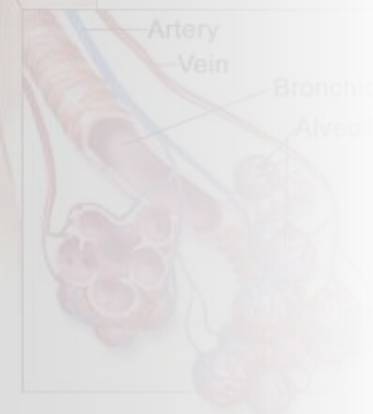
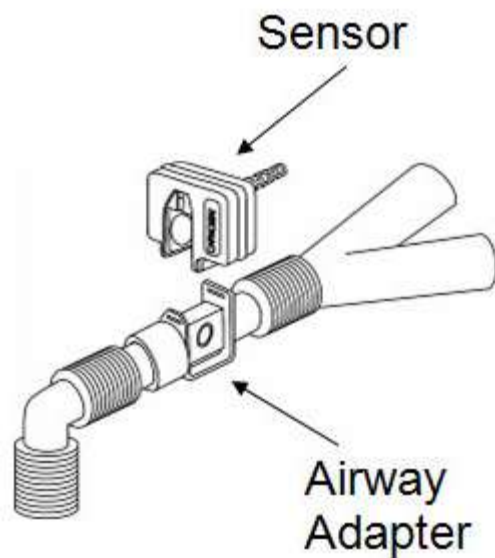
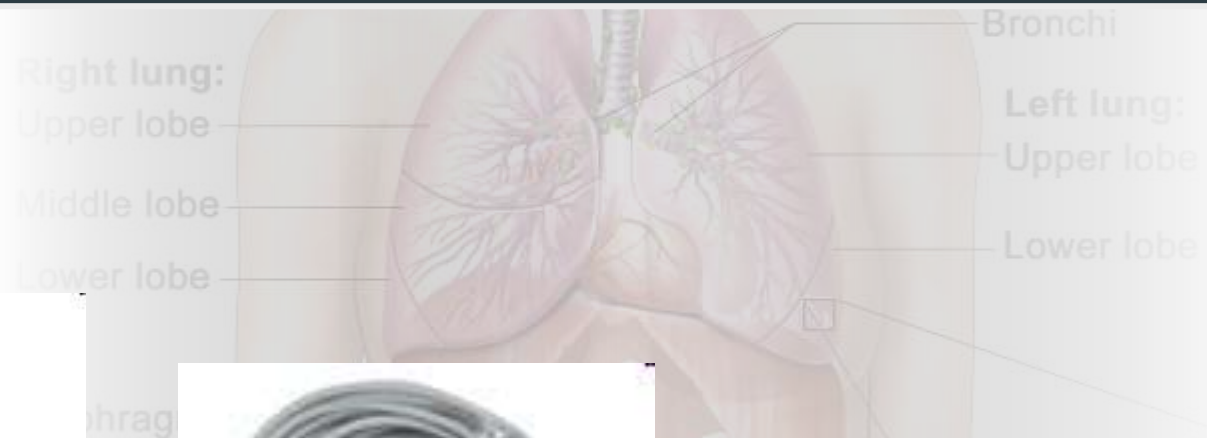
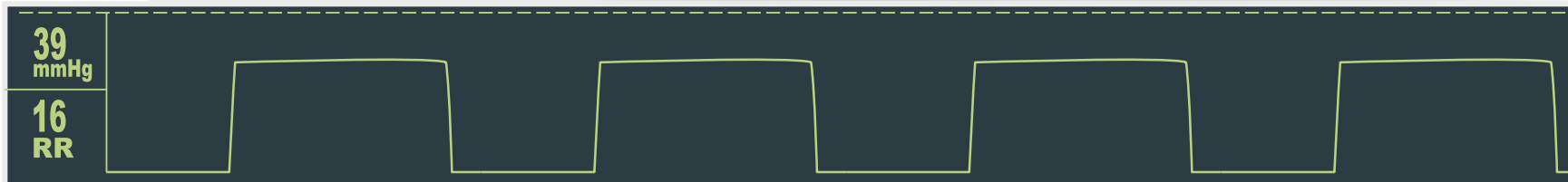


Jaffe M B Anesth Analg 2008;107:890-904

ANESTHESIA & ANALGESIA

Záznam parciálního tlaku CO₂

Normal

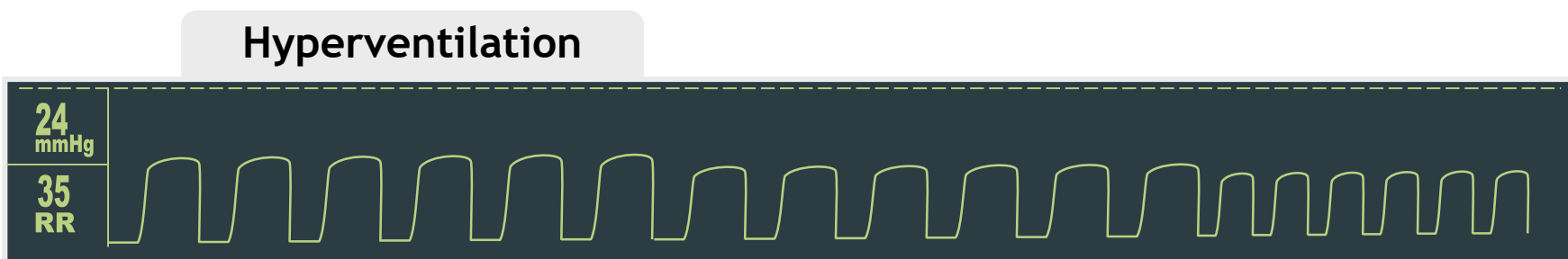
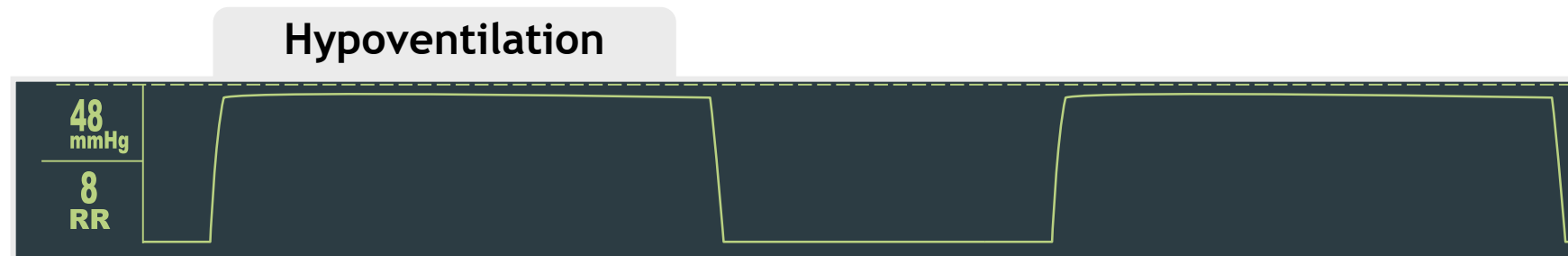
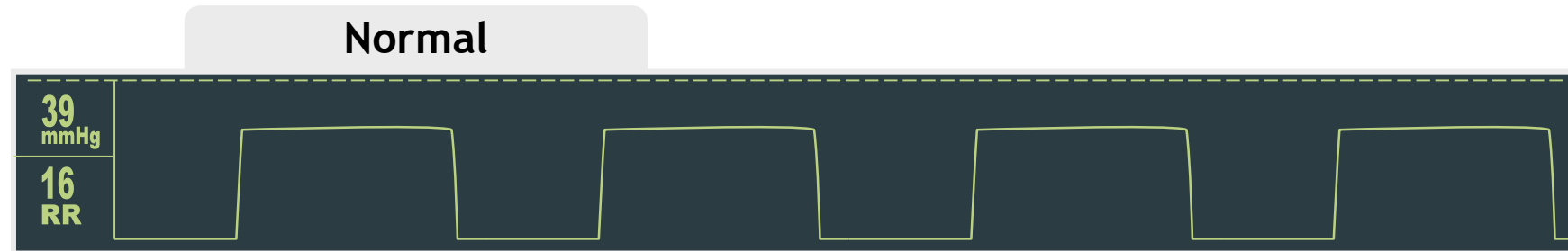


Parciální tlak CO₂ na konci výdechu

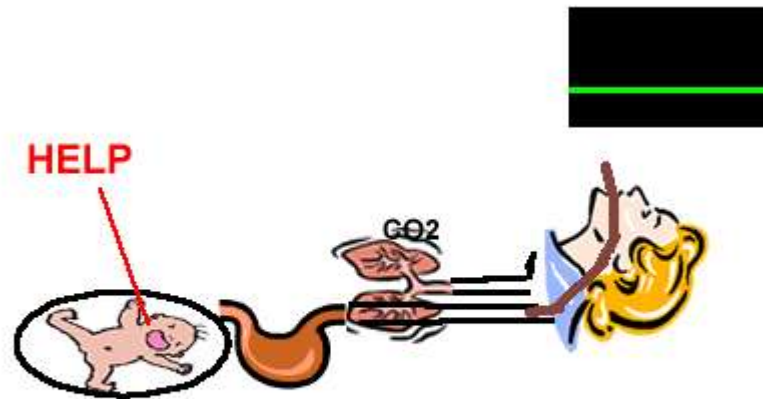
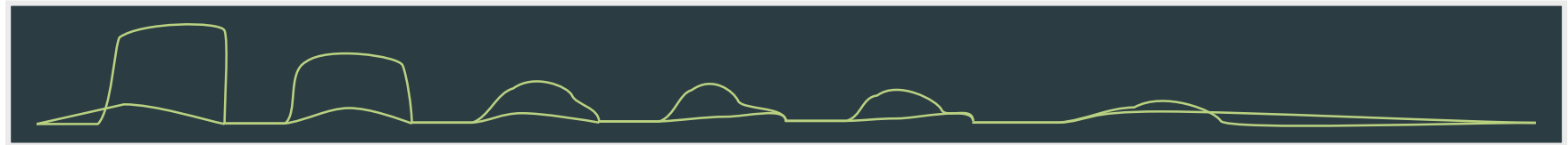
EtCO₂ – End Tidal CO₂

The measurement of exhaled CO₂ in the breath

Normal Range | 35-45 mmHg



Ověření správné intubace - například při císařském řezu



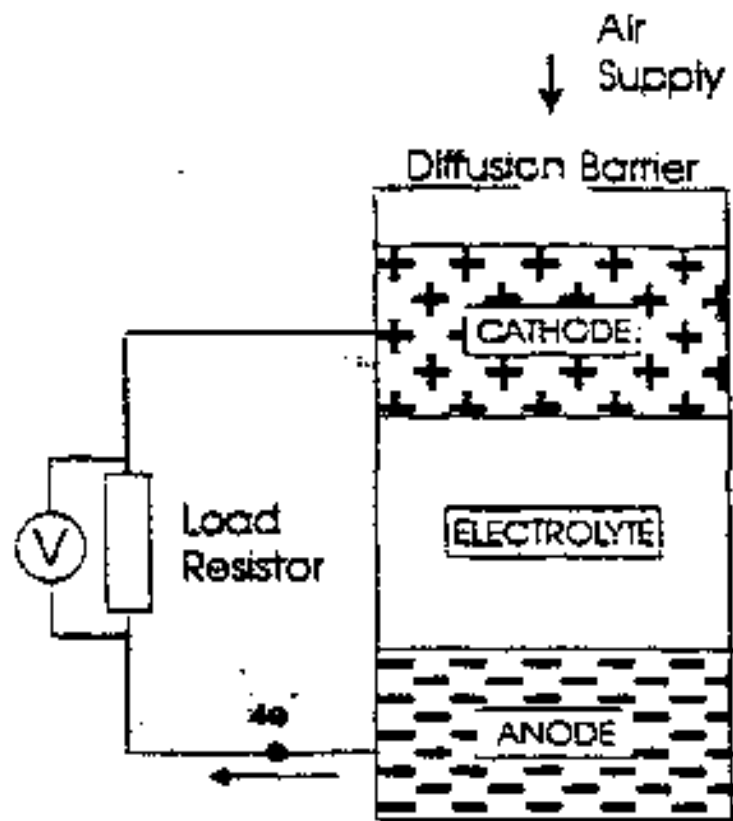
Měření výměny plynů

- ▶ Nepřímá kalorimetrie
- ▶ Kinetika O_2

$$dV(O_2)/dt = CO \times (O_{2art} - O_{2ven})$$



O₂ senzor



Omezená doba života !!!!!

Výdej energie

- ▶ $V(\text{O}_2) = V (F_i (\text{O}_2) - F_e(\text{O}_2)H_f)$
- ▶ $V(\text{CO}_2) = V (F_e(\text{CO}_2)H_f - F_i (\text{CO}_2))$
- ▶ $EE = (3.9 V(\text{O}_2) + 1.1 V(\text{CO}_2)) \times 1440$ (kcal/den, L/min).

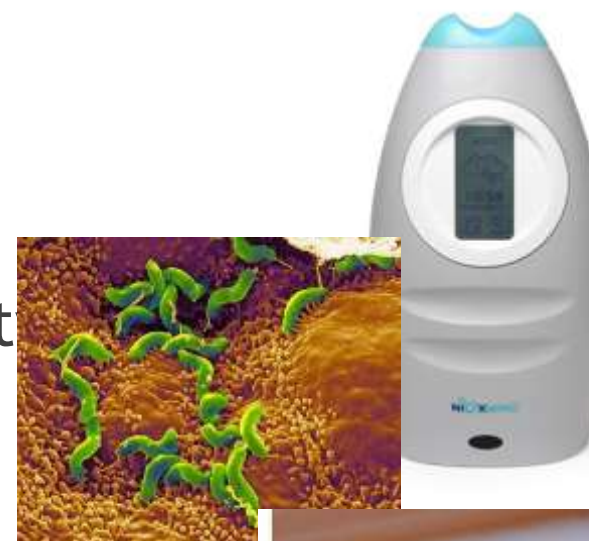
Respirační kvocient (RQ)

- ▶ Poměr mezi $V \cdot \text{CO}_2$ and $V \cdot \text{O}_2$ souvisí s metabolismem *RQ*:
- ▶ $RQ = V \cdot \text{CO}_2 / V \cdot \text{O}_2$.
- ▶ Normálně se pohybuje mezi 0.70 and 1.00.

Substrate	Gas volume equivalent of 1 g of substrate (ml)			Caloric value
	O ₂	CO ₂	RQ	
Carbohydrate	830	830	1.00	4.2
Fat	2020	1430	0.71	9.5
Protein	970	780	0.81	4.3

Současné dechové testy

- ▶ NO, oxid dusnatý, astma
- ▶ $^{13}\text{CO}_2$ isotopicky značený oxid uhličitý
funkční diagnostika, Helicobacter Pylori
- ▶ H_2 , vodík, malabsorbce fruktozy a laktózy (někdy společně s CH_4)
- ▶ Ethanol, požití alkoholu

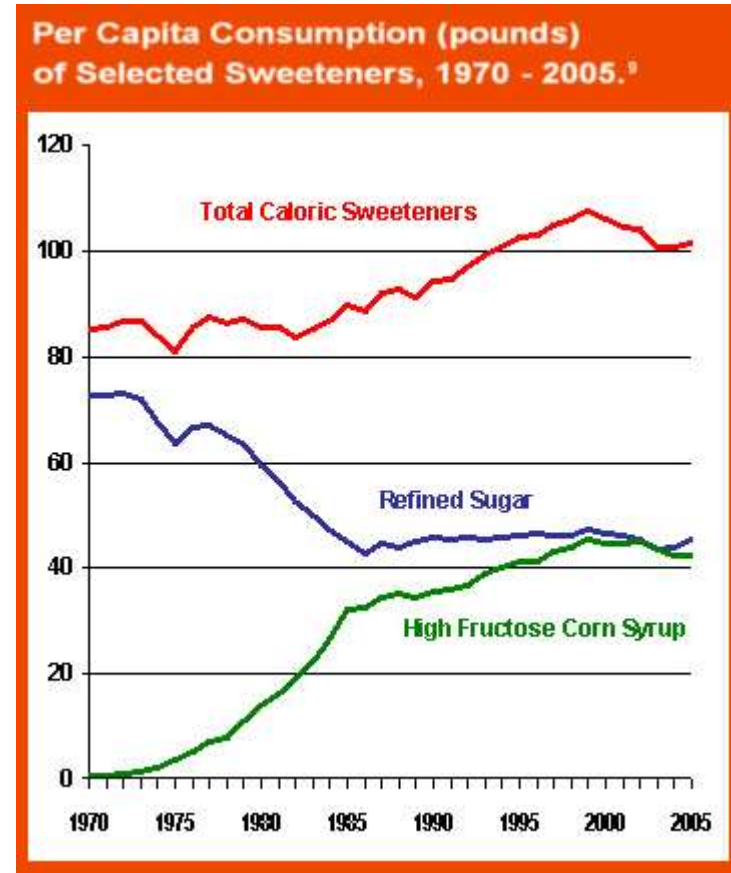


Substrát dechového testu	Klinicko-laboratorní korelace
^{13}C – triolein	steatorhea > 11–14 g/den
^{13}C – hiolein	intraluminální lipolýza
^{13}C – mixed triglyceride	specifická k pankreatické lipáze, výdej lipázy < 90 kU/hod.
^{13}C – cholesteryl octanoate	pankreatická cholesterol esteráza, steatorhea > 11 g/den
^{13}C – tripalmitin	malabsorpce tuků
^{13}C – trioctanoin	tkáňové poškození fibróza > 30 %
^{13}C – starch	sekrece amylázy < 10 %



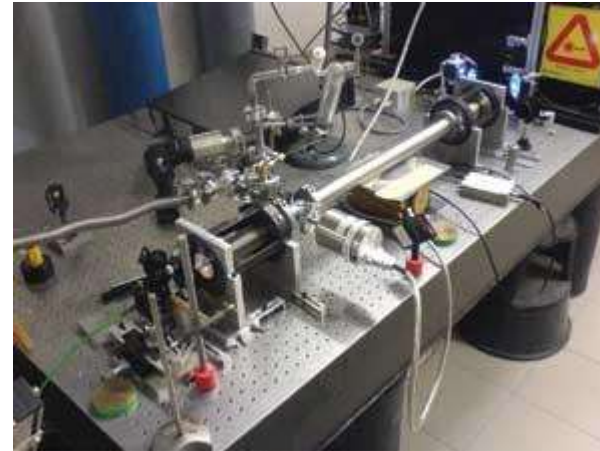
Malabsorpční syndrom

- ▶ **Malabsorpce laktózy.** Deficit laktázy, který postihuje asi 10% naší populace a je hlavní příčinou nesnášenlivosti mléka
- ▶ **Malabsorpce fruktózy.** (až 30% populace). Metabolický podklad malabsorpce fruktózy: pravděpodobně způsobena poruchou přenašeče fruktózy v tenkém střevě. Požití fruktózy tak vede k bolestem břicha a průjmům. Chorobu lze diagnostikovat dechovým testem po perorálním podání fruktózy.
- ▶ **Stanovení rychlosti evakuace žaludku.** Dechový test s podáním ¹³C-oktanové kyseliny (kyselina kaprylová) je neinvazivním testem gastrické evakuace.

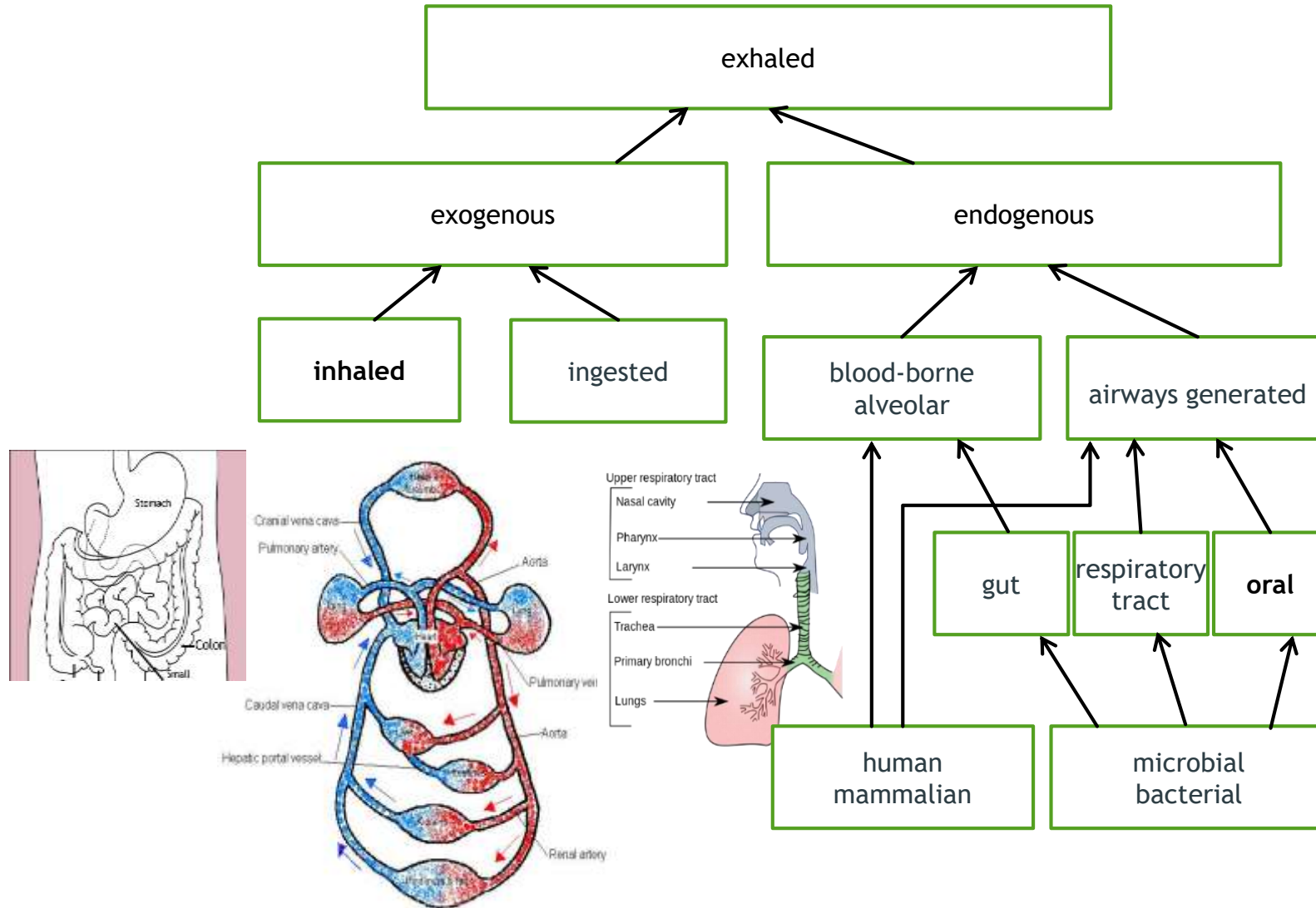


Analýza stopových těkavých látek v lidském dechu

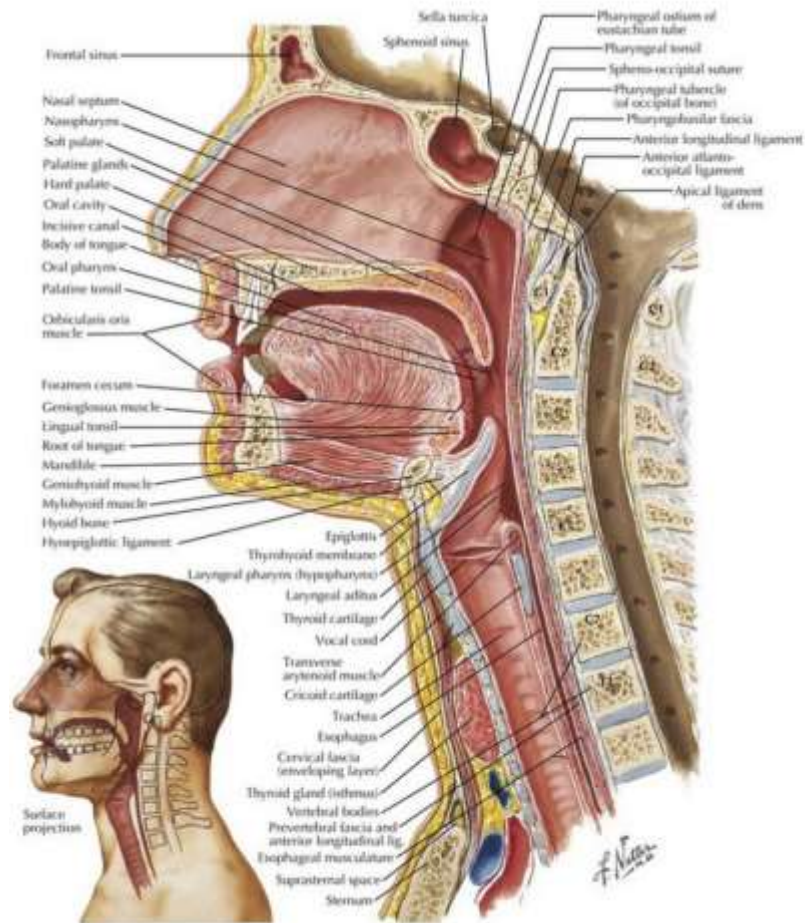
- ▶ Hmotnostní spektrometrie
- ▶ Plynová chromatografie (GC/MS)
- ▶ Laserová spektrometrie
- ▶ Senzory



Původ těkavých látek v dechu



Laminární a turbulentní proudění dýchacími cestami



- ▶ $Re = \rho v d / \mu$
- ▶ At $Re > 500$ flow becomes turbulent
- ▶ Resistance + **mixing**

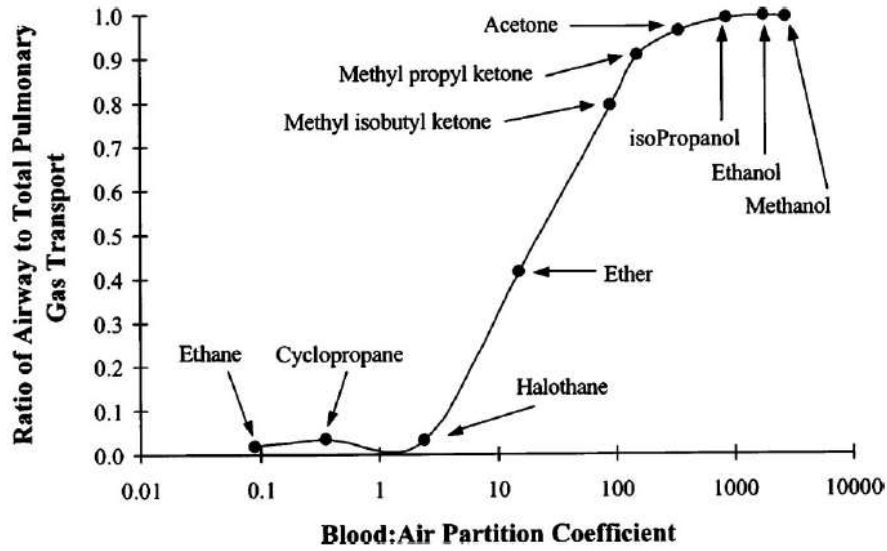
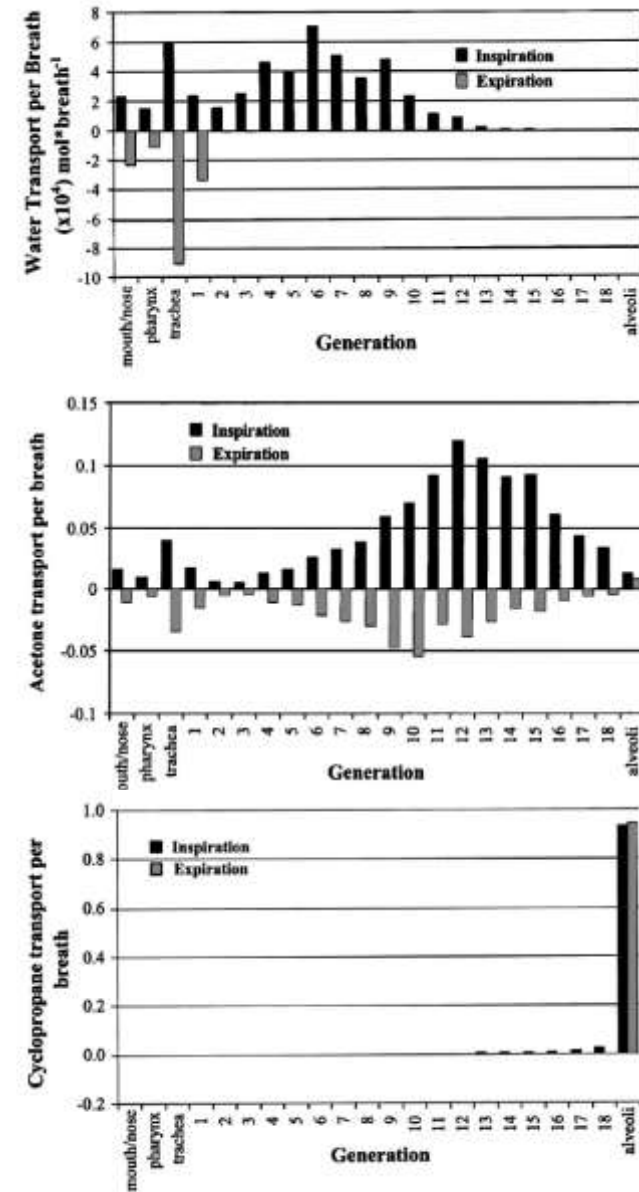


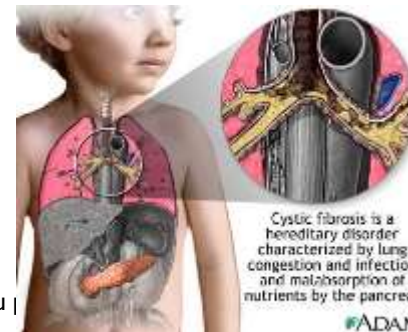
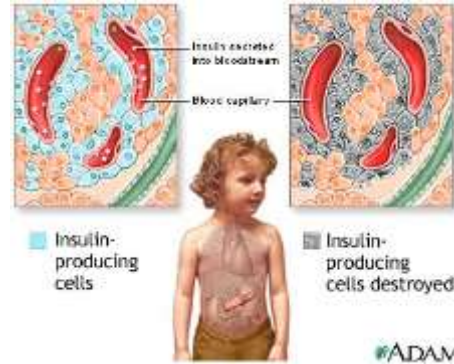
FIGURE 4. Ratio of airway gas exchange to total pulmonary gas exchange [Eq. (10)] is plotted vs. $\lambda_{b:a}$ for ten soluble gases as calculated from the airway–alveolar gas exchange model during tidal breathing. Greater than 95% of ethane, cyclopropane, and halothane gas exchange in the alveoli. The exchange of ether is partitioned equally between the airway and alveoli. Acetone and gases with a $\lambda_{b:a}$ greater than acetone exchange completely in the airways.

Rozpustnost



Výzkum možností analýzy dechu

- ▶ Fyziologie
- ▶ Diabetes
- ▶ Cystická fibróza
- ▶ Návykové látky
- ▶ Idiopatické střevní choroby
- ▶ Nádory

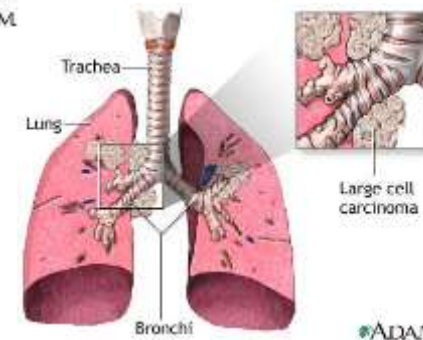


Cystická fibróza

Recesivní vrozené onemocnění způsobené mutací genu | protein CFTR u 1 ze 4000 dětí.

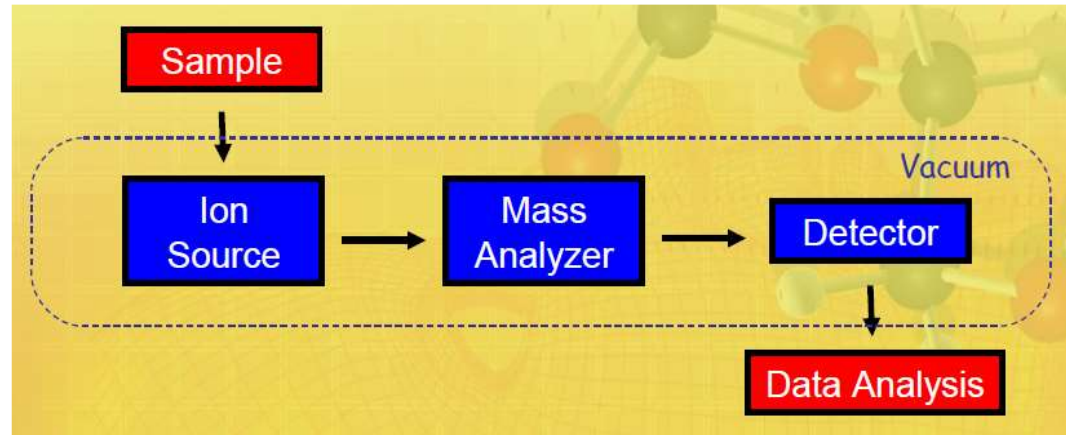
Příznaky: Vysoká koncentrace sodných a/nebo chloridových iontů v potu, časté (někdy trvalé) záněty dýchacího ústrojí způsobené bakteriemi - *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*. Pseudomonády jsou těžko léčitelné, neboť se obalí mikrofilmem a znemožní přístup antibiotikům. Dále se často objevují záněty slinivky, snížená mobilita trávicí trubice či cirhóza jater.

Léčba se soustředí zejména na léčbu dýchacího ústrojí - fyzioterapie, antibiotika. Smrt nastává nejčastěji mezi 20. a 30. rokem života.



Hmotnostní spektrometrie

- ▶ **Hmotnostní spektrometrie** je analytická technika založená na měření poměru hmotnosti a náboje elektricky nabitých částic.
- ▶ Proč není možné analyzovat neutrální molekuly?



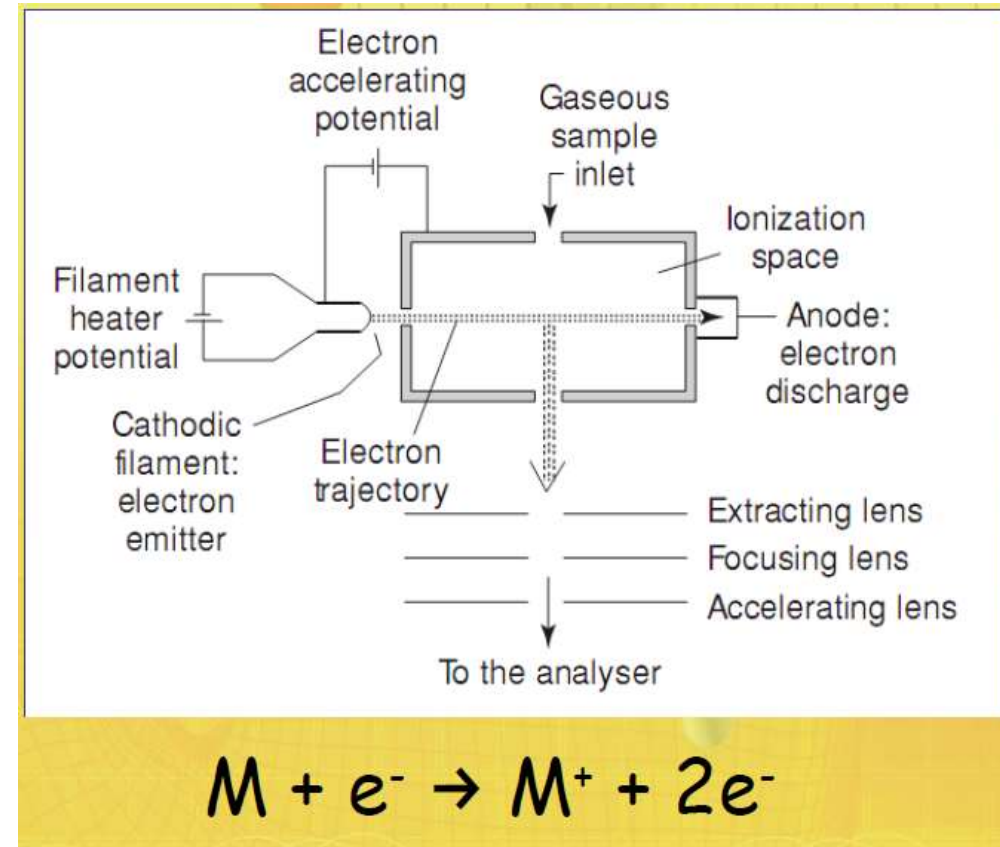
1. Příprava iontů ze vzorku
2. Separace iontů podle poměru hmotnosti a náboje
3. Detekce počtu iontů každého druhu
4. Vytvoření hmotnostního spektra

Magnetický sektorový hmotnostní spektrometr

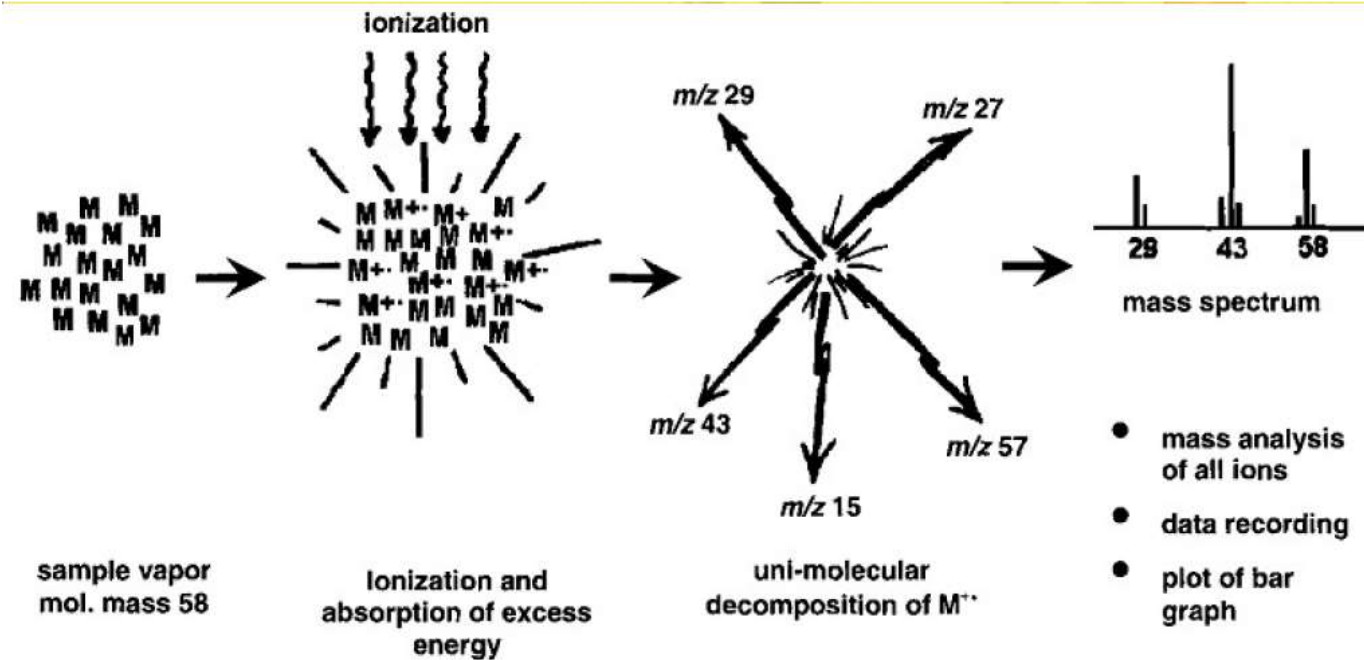


Elektronová ionizace

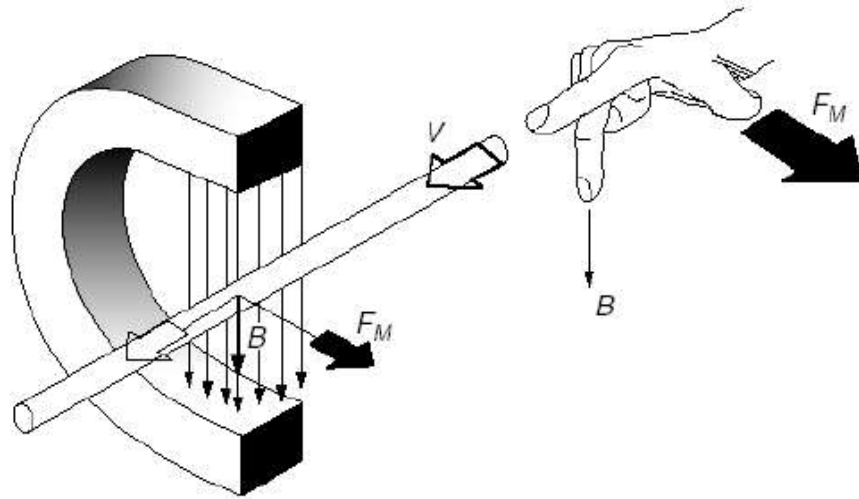
- Energie elektronů obvykle kolem 70 eV
- charakteristická fragmentace
- existují rozsáhlé knihovny spekter



Fragmentace



Action of Electrostatic and Magnetic Field on the charged particles



Orientation of the magnetic force on a moving ion.

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV_s$$

$$F_M = qvB$$

$$qvB = \frac{mv^2}{r}$$

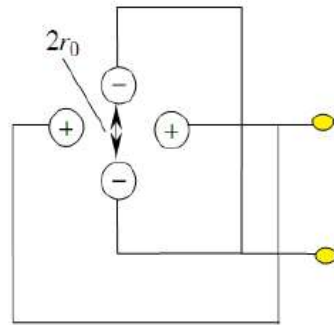
$$\frac{m}{q} = \frac{r^2 B^2}{2V_s}$$

If the radius r is imposed by the presence of a flight tube with a fixed radius r , for a given value of B only the ions with the corresponding value of m/q go through the analyser. Changing B as a function of time allows successive observations of ions with various values of m/q . If $q = 1$ for all of the ions, the magnetic analyser selects the ions according to their mass, provided that they all have the same kinetic energy. Thus the magnetic analyser (which is fundamentally a momentum analyser) can be used as a mass analyser provided that the kinetic energy of the ions or at least their velocity is known.

Quadrupólový hmotnostní spektrometr

Mass Analyzer

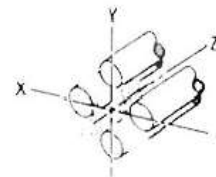
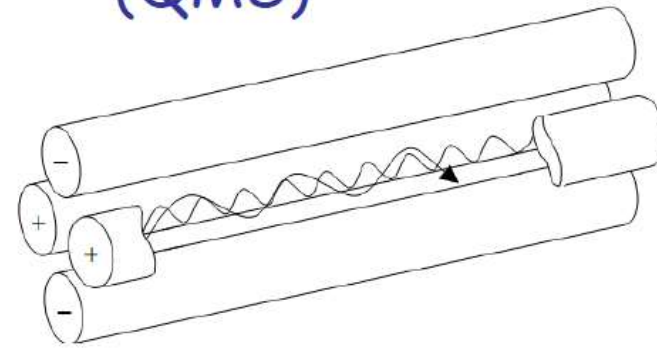
Quadrupole Mass Spectrometer (QMS)



$U + V \cos \omega t$

U - dc voltage

$V \cos \omega t$ - rf voltage

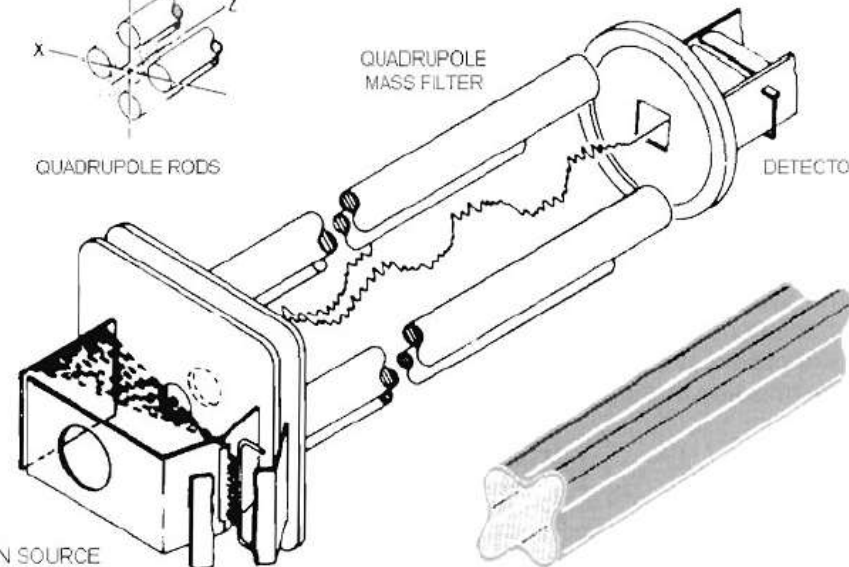


QUADRUPOLE RODS

QUADRUPOLE MASS FILTER

DETECTOR

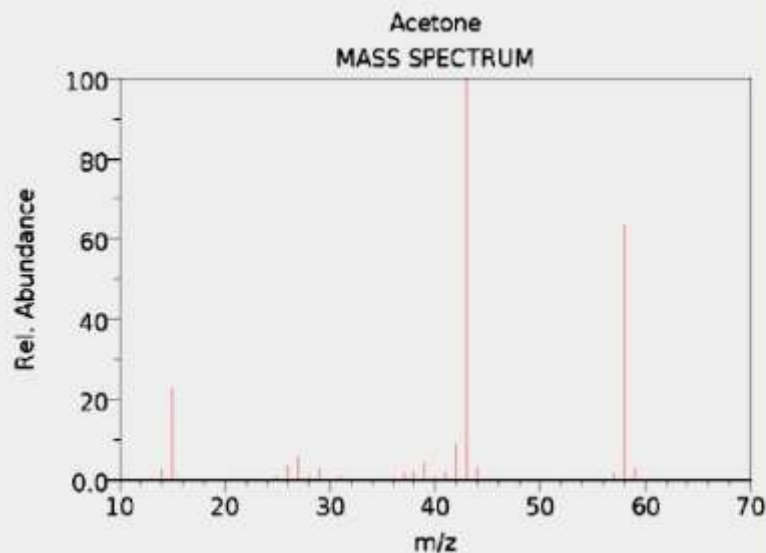
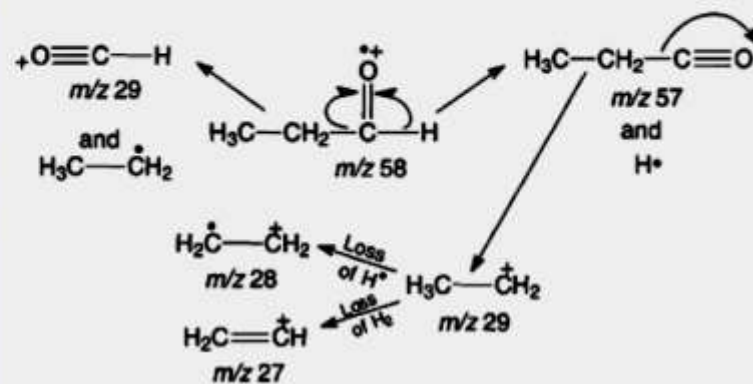
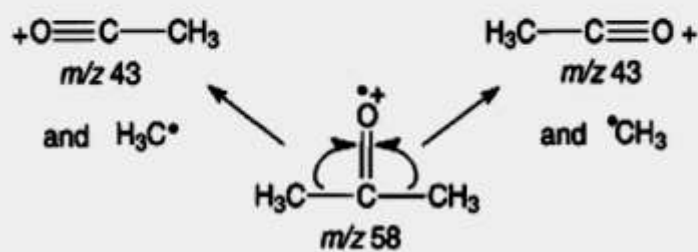
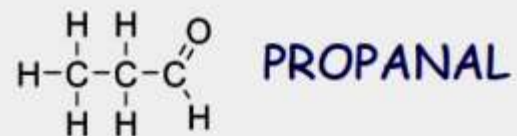
ION SOURCE



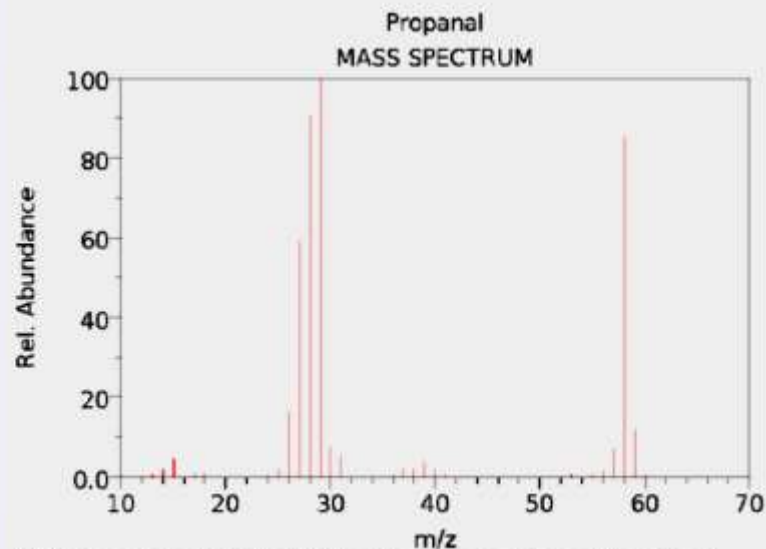
EI Mass Spectra



SAME MOLECULAR WEIGHT: 58



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Hmotnostní spektrometrie v medicíně

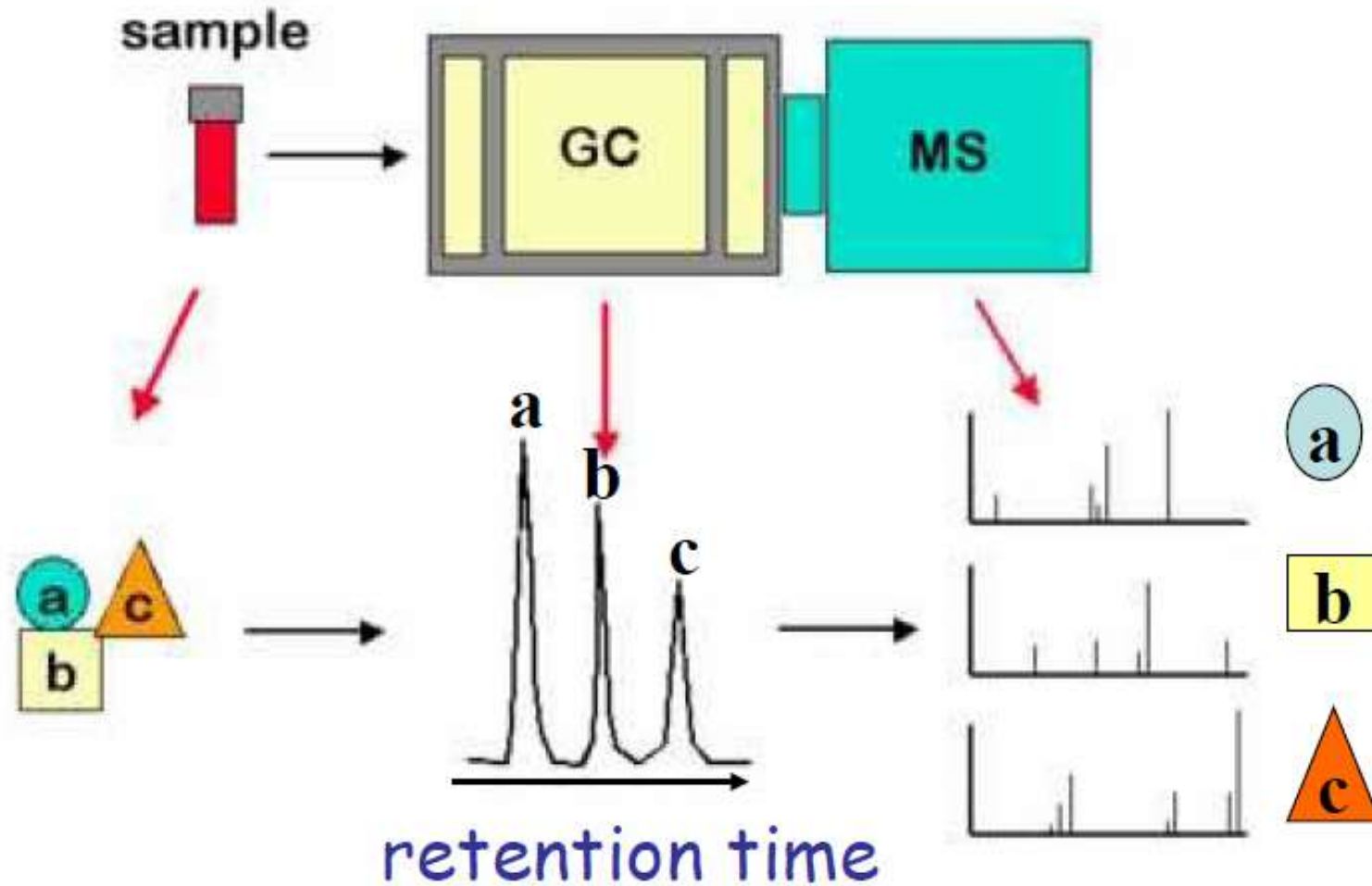
1. GC/MS
2. ESI ElectroSpray Ionization
3. MALDI Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
4. Tandem MS (MS^2)

Nobelovy ceny za chemii

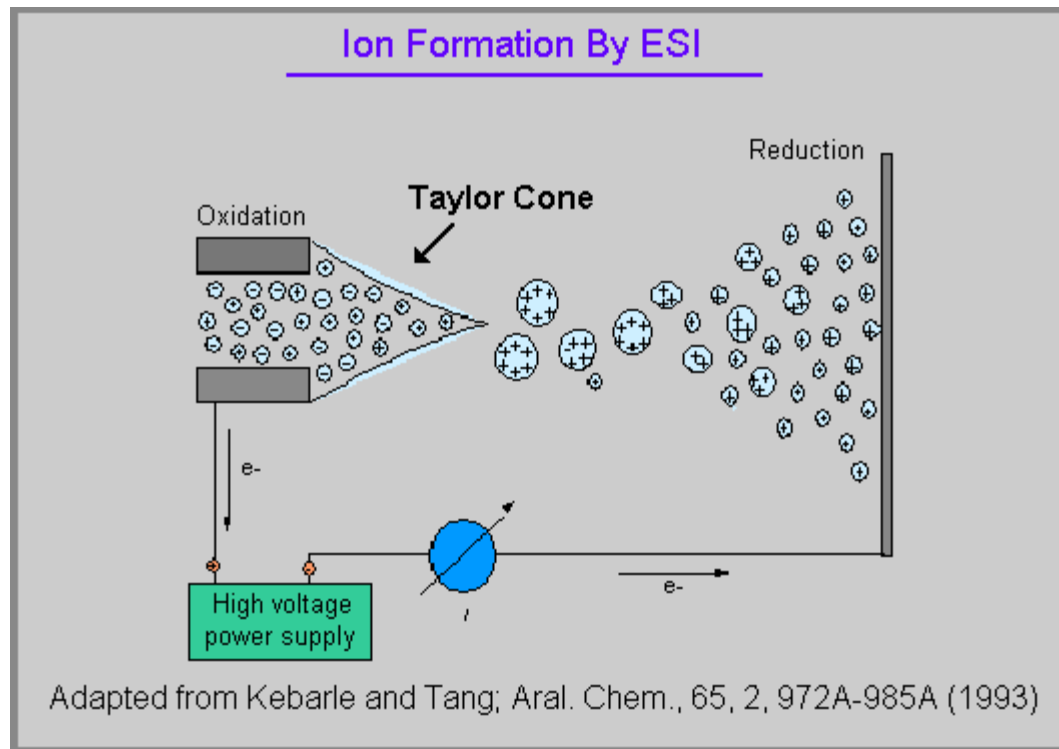
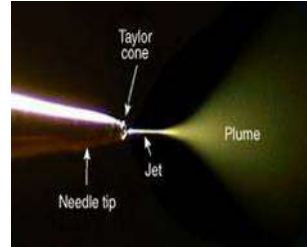
1952 Martin and Synge, GC.

2002 John B. Fenn ESI, Koichi Tanaka MALDI

Princip plynové chromatografie GC-MS



ESI - Ionizace elektrosprejem

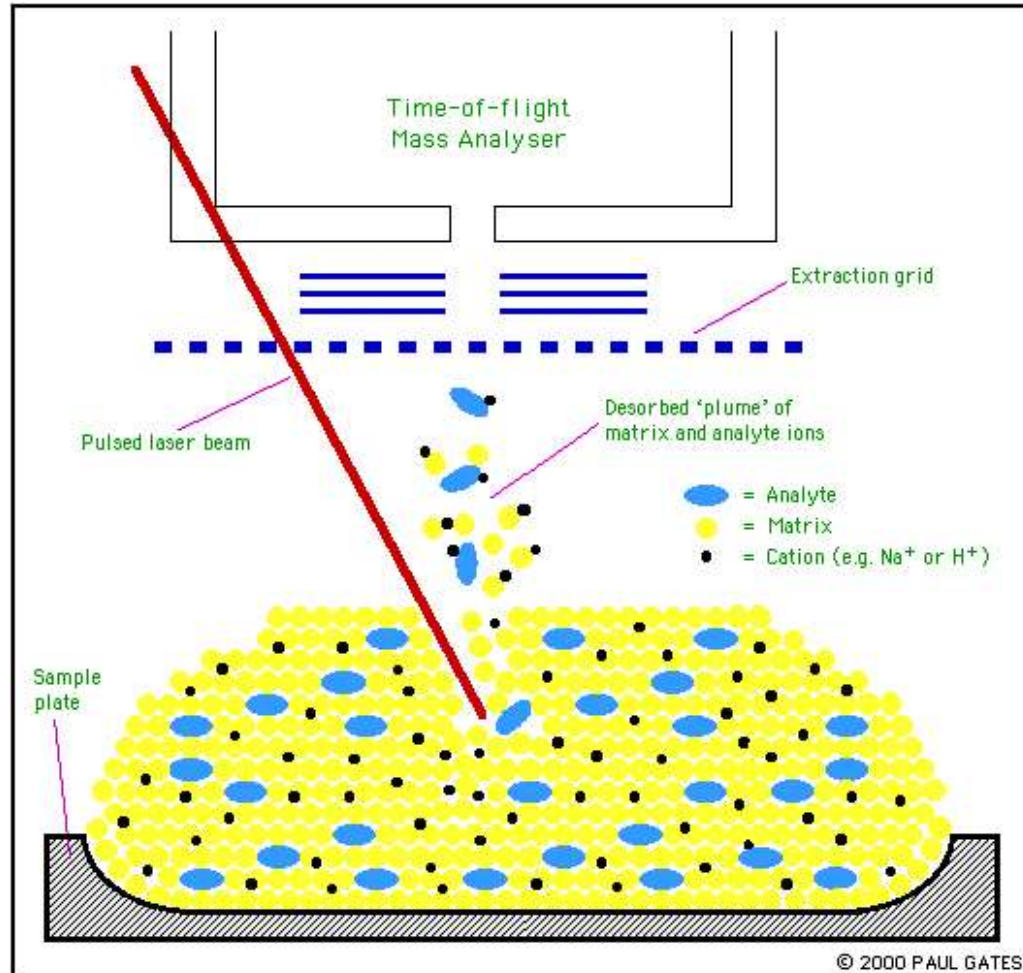


Voda - metanol - acetonitril

Zvýšení vodivosti - kyselina mravenčí

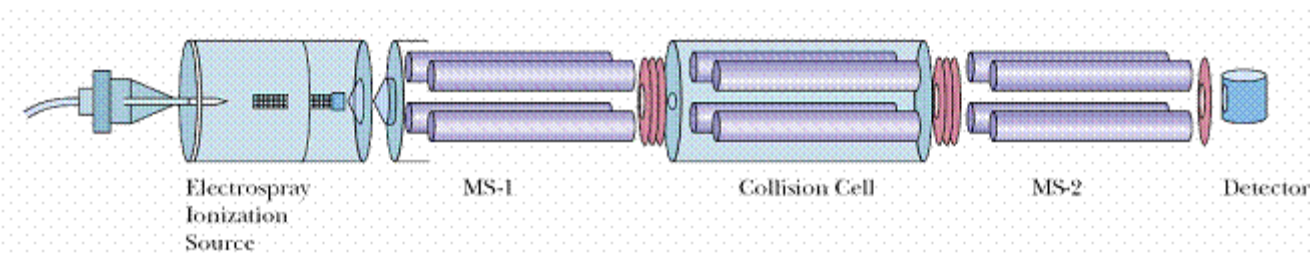
Rozpouštědlo se vypařuje -
zbydou volné ionty

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization



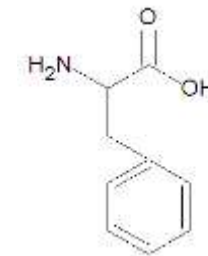
Novorozenecký screening

- ▶ **Pravděpodobnost**, že právě u jednoho konkrétního vyšetřovaného novorozence bude zjištěno některé z uvedených onemocnění, je **velmi malá**. Stane se tak pouze u jednoho dítěte z přibližně 1150 právě narozených. Právě jemu ale novorozenecký screening pomůže uchránit zdraví, někdy i život, a z hlediska ekonomie zdravotnictví sníží náklady na jeho léčbu, protože náklady na léčbu komplikací vzniklých z pozdě diagnostikované choroby bývají mnohem vyšší.
- ▶ Významným mezníkem v rozvoji novorozeneckého screeningu v ČR se stal 1. říjen 2009. Od tohoto data došlo Metodickým návodem uvedeným ve Věstníku MZ ČR částka 6 vydaného 12. 8. 2009 k **zavedení metodiky tandemové hmotnostní spektrometrie do pravidelného celoplošného novorozeneckého screeningu v ČR a tím i k rozšíření spektra vyšetřovaných chorob na celkem 13 (CH, CAH, CF, PKU a 9 dalších metabolických poruch).**

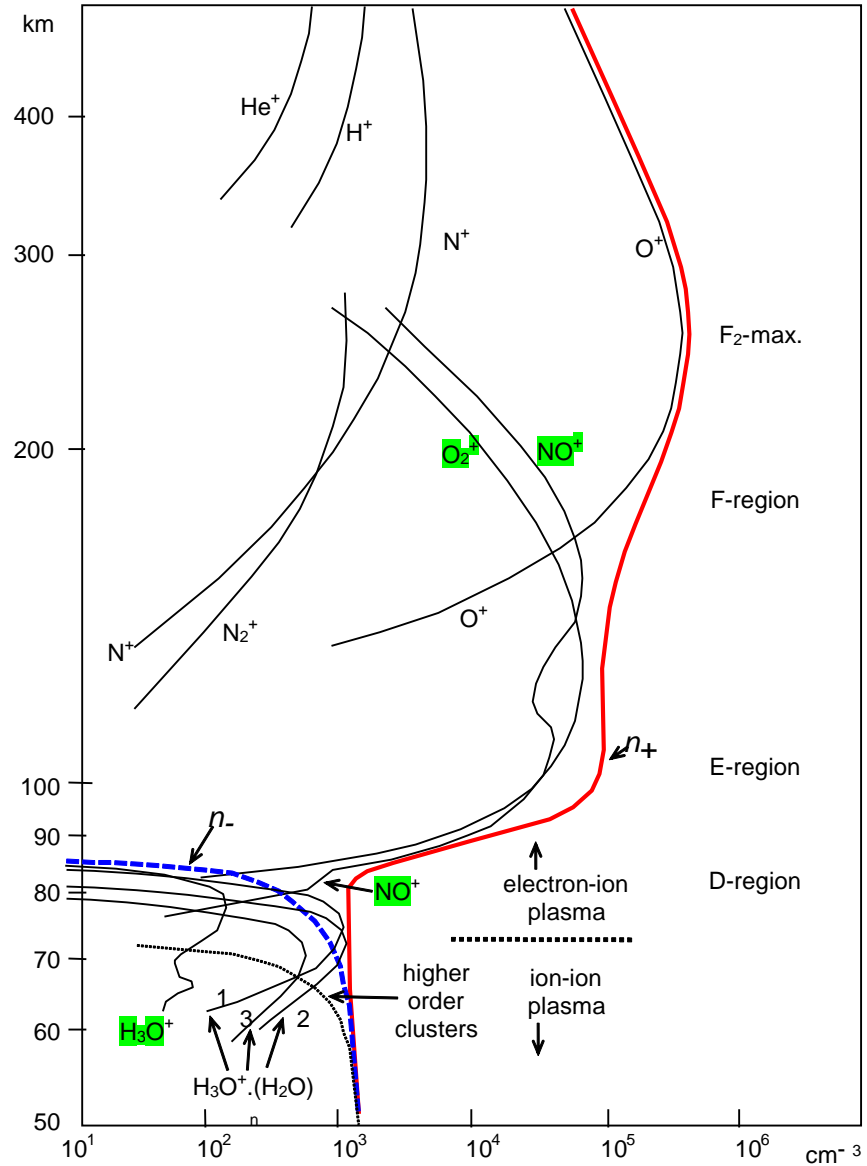
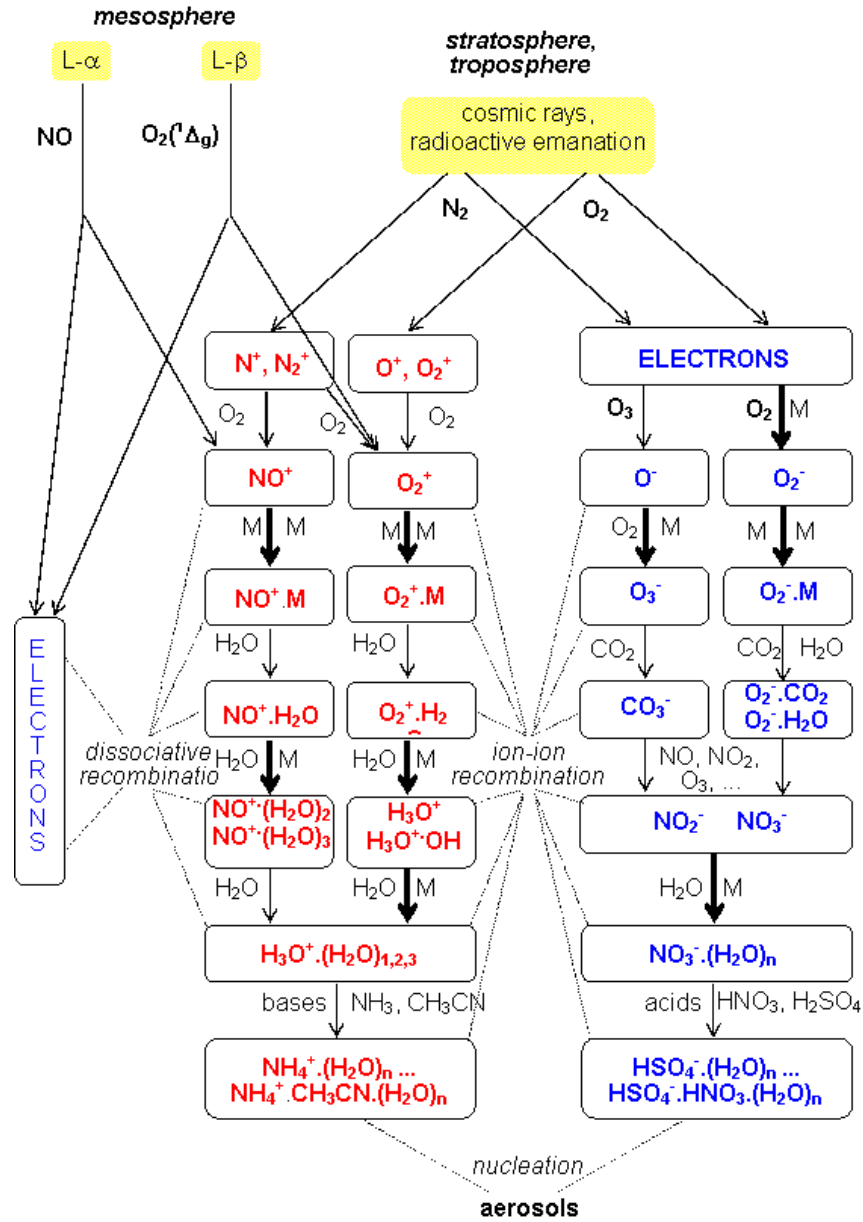


Novorozenecký screening

- ▶ V České republice se tč. vyšetřuje 13 onemocnění:
- ▶ vrozená snížená funkce štítné žlázy (**kongenitální hypotyreóza - CH**)
- ▶ vrozená nedostatečnost tvorby hormonů v nadledvinách (**kongenitální adrenální hyperplazie - CAH**)
- ▶ vrozená porucha tvorby hlenu (**cystická fibróza - CF**)
- ▶ dědičné poruchy látkové výměny aminokyselin
 - ▶ vrozená porucha látkové výměny aminokyseliny fenylalaninu (**fenylketonurie - PKU a hyperfenylalaninemie - HPA**)
 - ▶ vrozená porucha látkové výměny větvených aminokyselin (**leucinóza, nemoc javorového sirupu - MSUD**)
 - ▶ **glutarová acidurie typ I (GA I)**
 - ▶ **izovalerová acidurie (IVA)**
- ▶ dědičné poruchy látkové výměny mastných kyselin
 - ▶ deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (**deficit MCAD**)
 - ▶ deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (**deficit LCHAD**)
 - ▶ deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (**deficit VLCAD**)
 - ▶ deficit karnitinpalmitoyltransferázy I (**deficit CPT I**)
 - ▶ deficit karnitinpalmitoyltransferázy II (**deficit CPT II**)
 - ▶ deficit karnitinacylkarnitintranslokázy (**deficit CACT**)

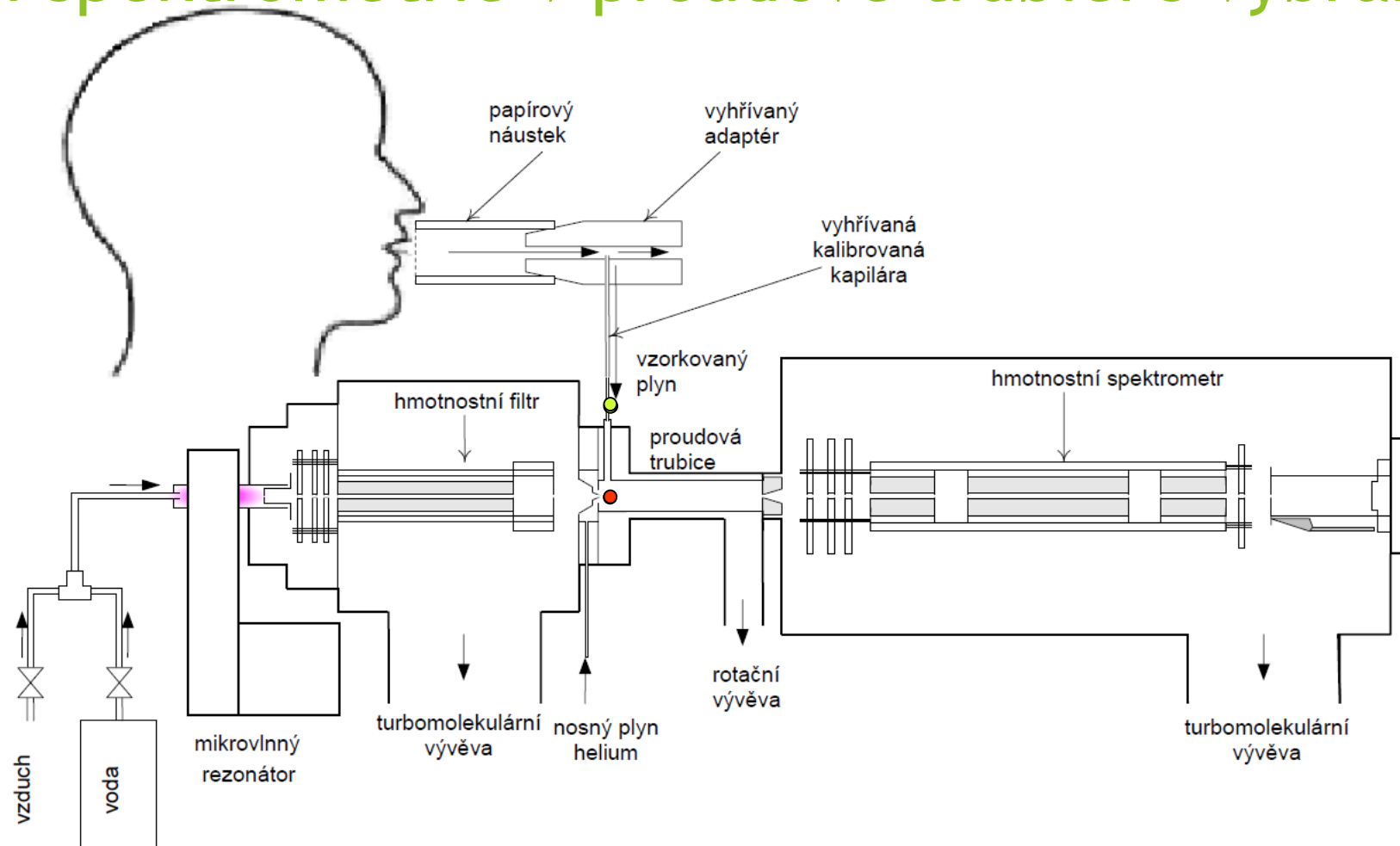


Atmosférické ionty



SIFT-MS

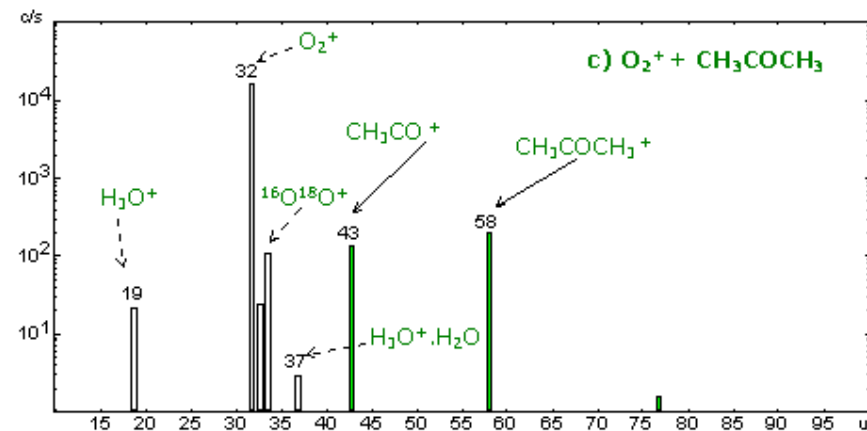
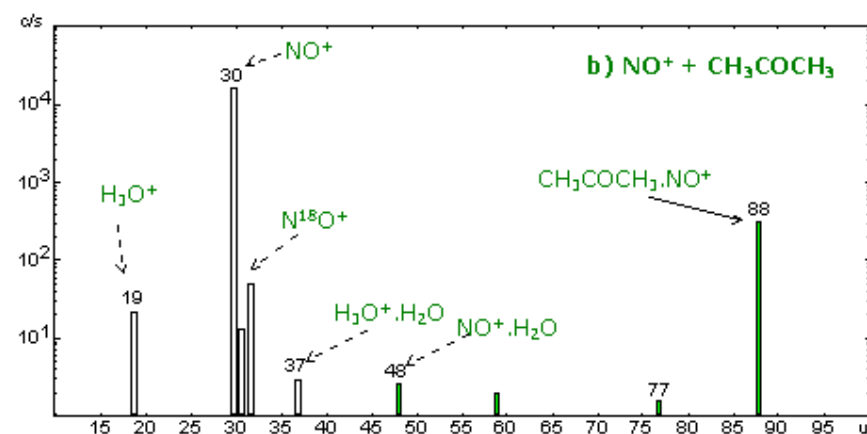
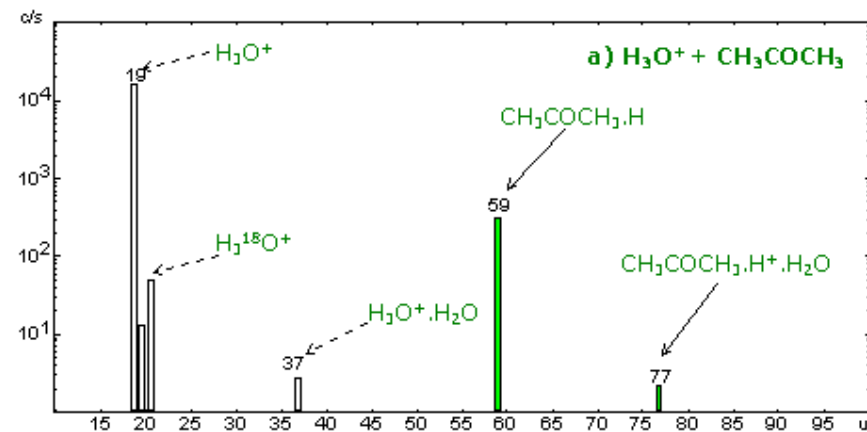
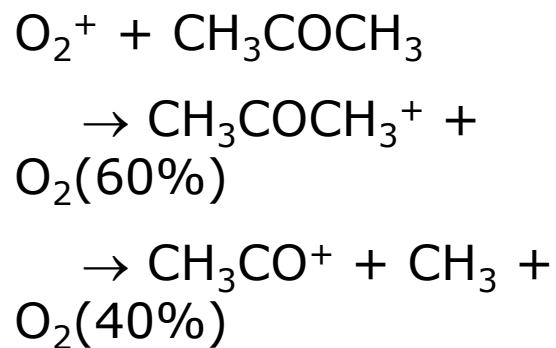
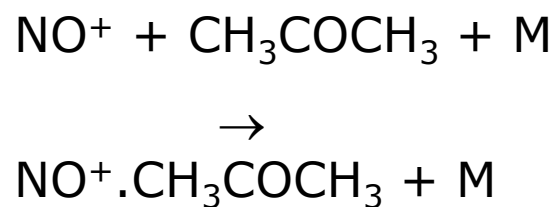
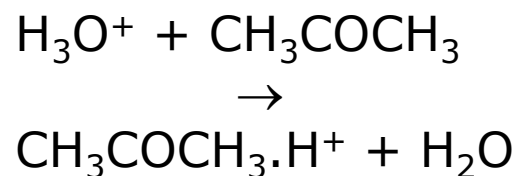
hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty



A directly coupled monolithic rectangular resonator forming a robust microwave plasma ion source for SIFT-MS
P Španěl, E.F.H. Hall, C.T. Workman and D Smith
Plasma Sources Sci. Technol. 13 (2004) 282-284.

Microwave plasma ion sources for selected ion flow tube mass spectrometry: Optimizing their performance and detection limits for trace gas analysis
Patrik Španěl, Kseniya Dryahina and David Smith
International Journal of Mass Spectrometry 267 (2007) 117-124.

H_3O^+ , NO^+ , O_2^+ chemická ionisace
acetonu



Analýza dechu

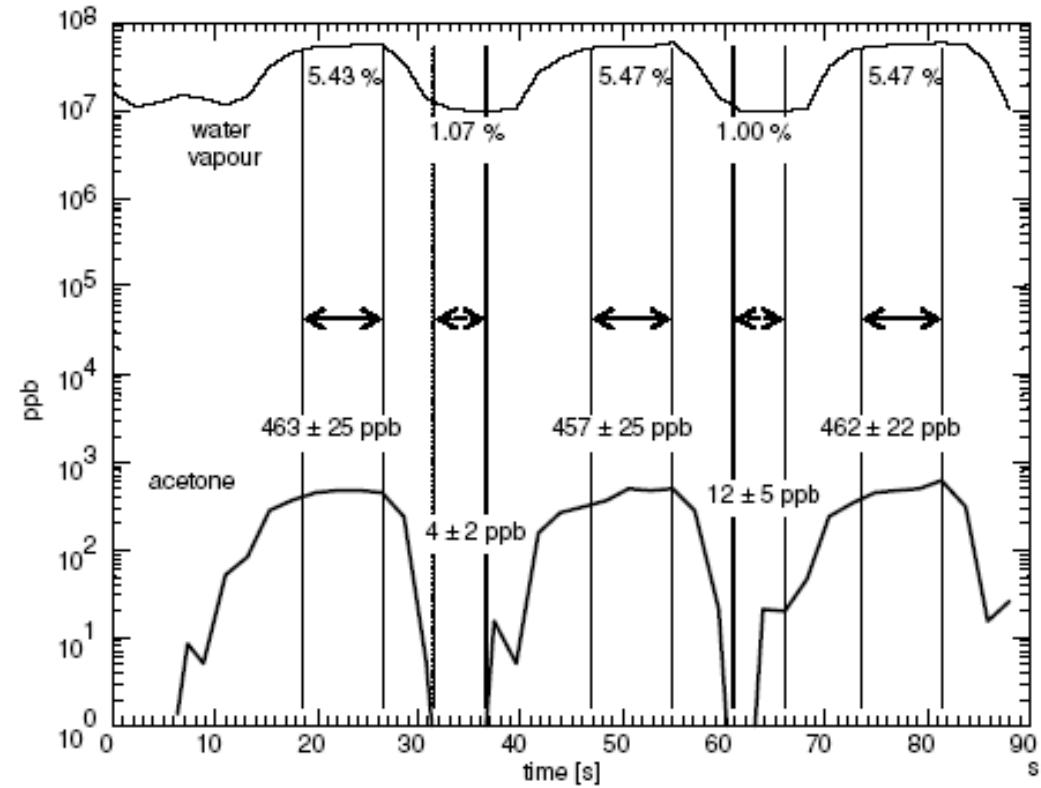
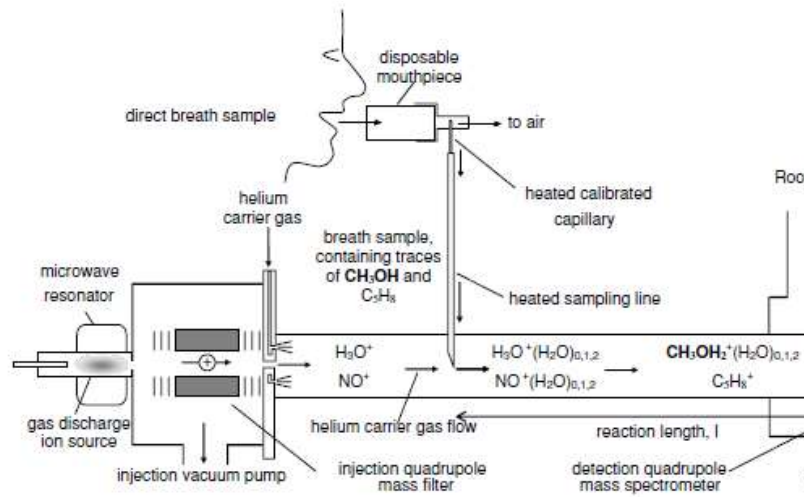
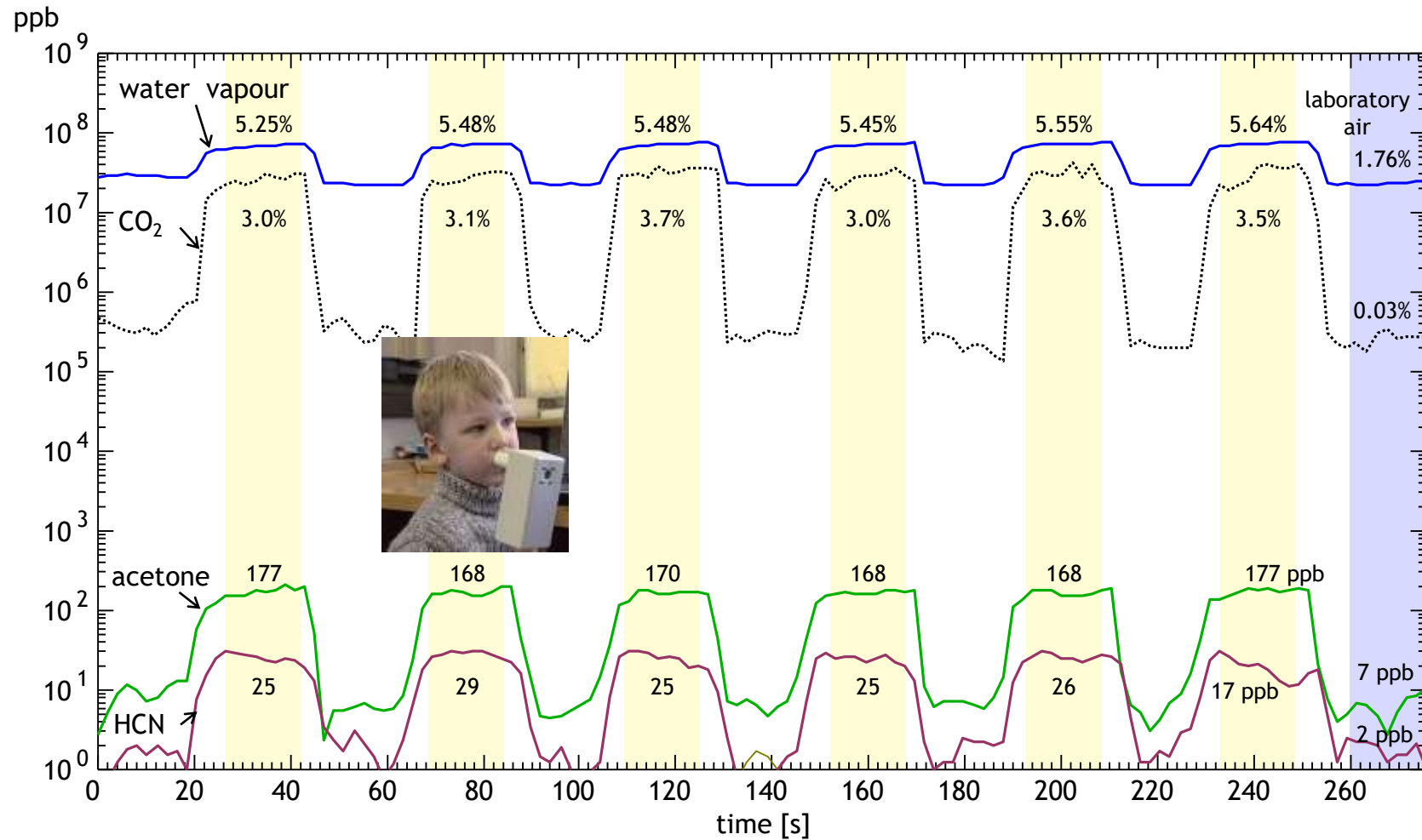
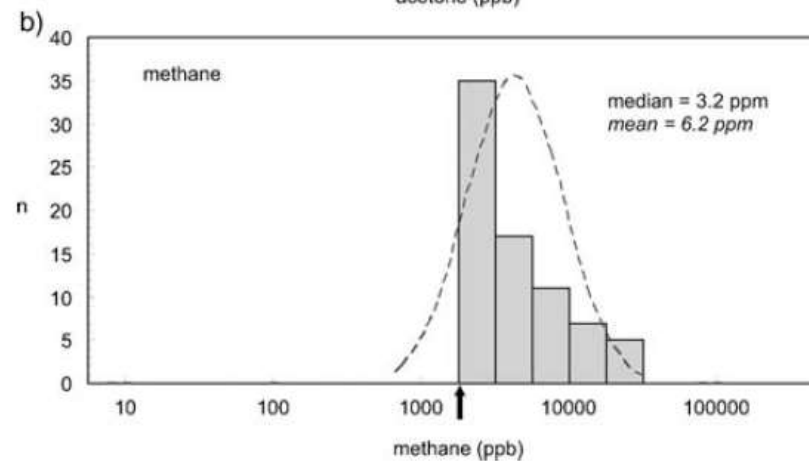
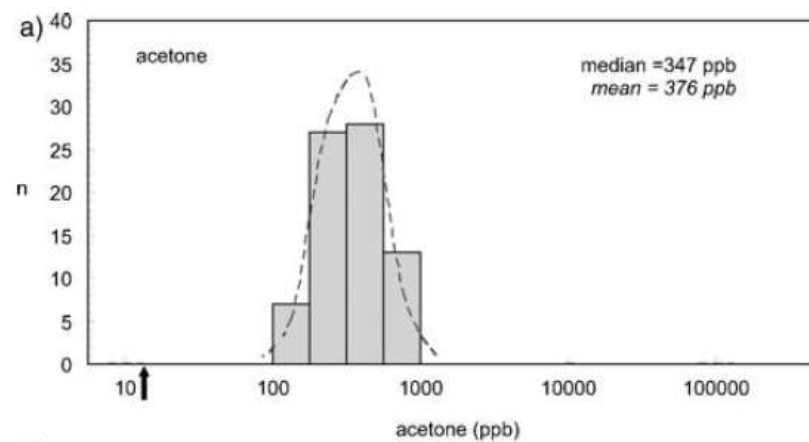
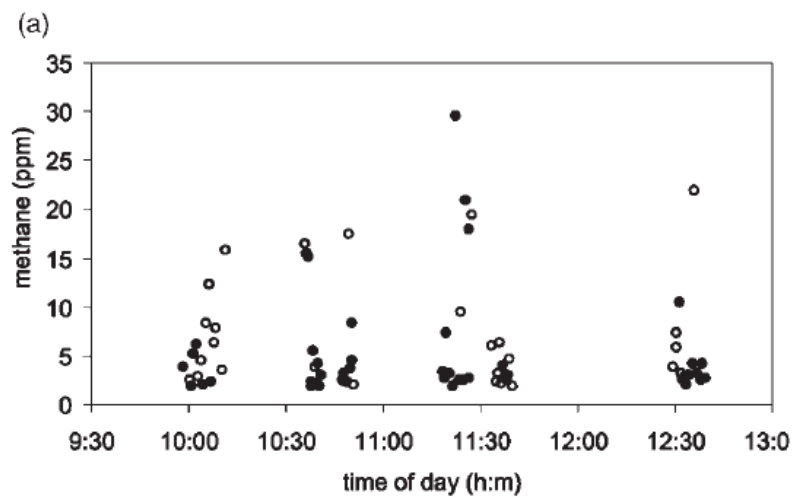


Figure 2. Quantitative SIFT-MS analysis of acetone levels in exhaled breath calculated using the ion signal ratios of the precursor ions (NO^+) and the characteristic product ion of acetone ($\text{NO}^+\cdot\text{CH}_3\text{COCH}_3$ at m/z 88), together with the known reaction time and the known sample and carrier gas flow rates. Both the alveolar portions of the exhalation and the ambient air portion are indicated, being used to calculate the mean exhalation levels and the levels in the laboratory air respectively. The water vapour concentration is calculated from the relative levels of the NO^+ precursor ions and its hydrates $\text{NO}^+(\text{H}_2\text{O})_{1,2}$.

On-line Analýza dechu

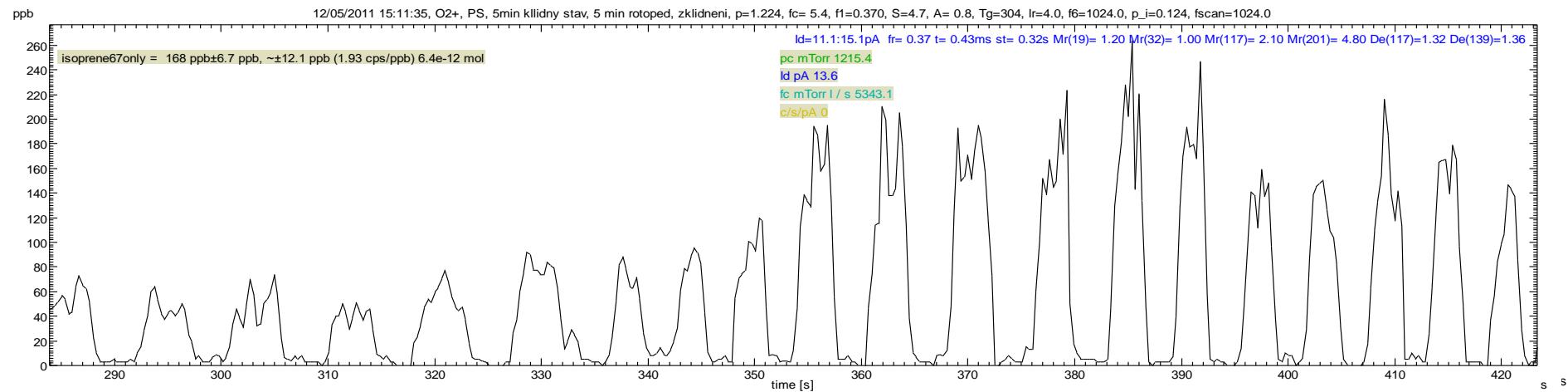
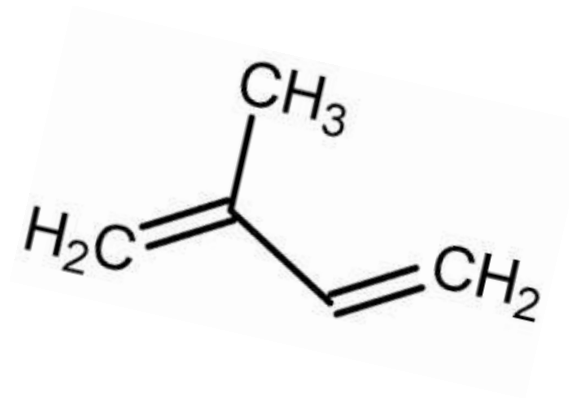


Metan a aceton v dechu



Quantification of methane in humid air and exhaled breath using selected ion flow tube mass spectrometry
K. Dryahina, D. Smith, P. Španěl
Rapid Commun. Mass Spectrom. 24 (2010) 1296-1304

Izoprén

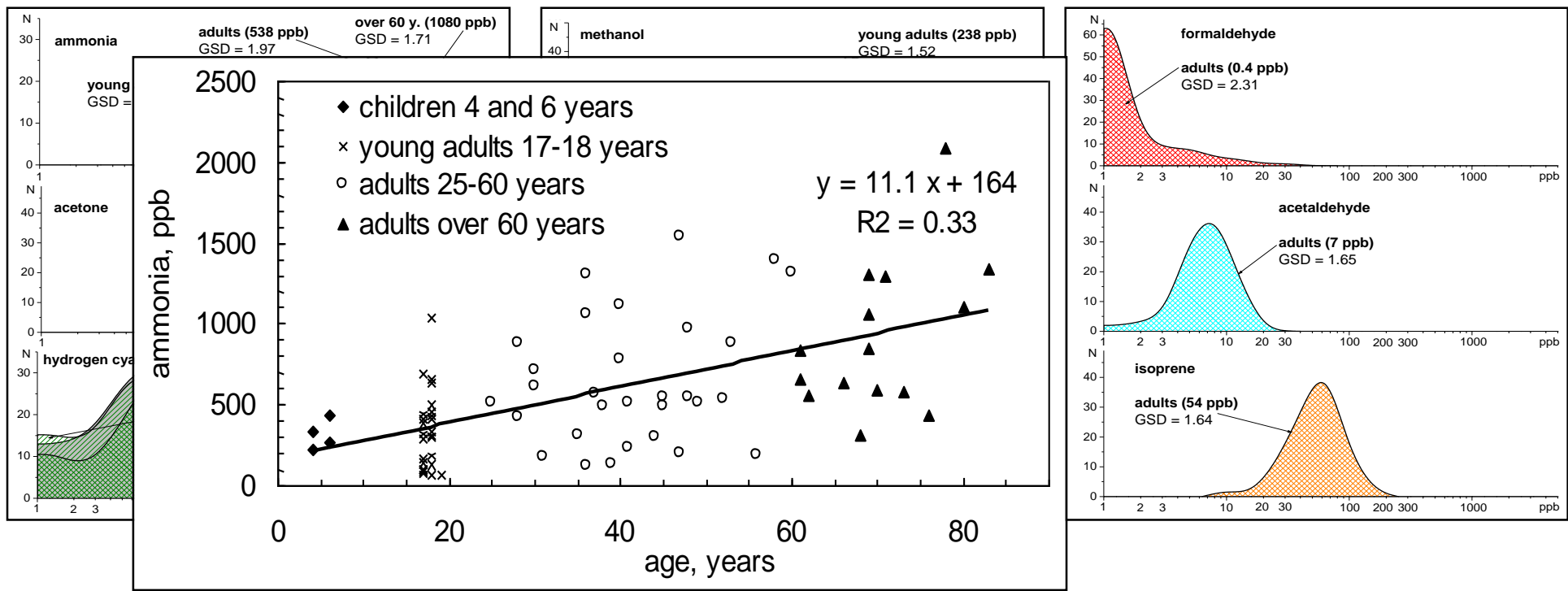


Jak se mění složení dechu s věkem?



Volunteer groups:		
Children N=4 (2 M, 2 F)	age 4 to 6 years	no disease reported
Young adults N=26 (10 M, 16 F)	age 17-19 years	1 asthmatic
Adults N=34 (11 M, 23 F)	age 25 to 62 years	6 asthamtics, 2 diabetics
Over 60 y. N=13 (10 M, 3 F)	age 60 to 83 years	4 diabetics

Distributions of breath levels measured in the "young adults", "adults" and "over 60 y." groups



Acetone, ammonia and hydrogen cyanide in exhaled breath of several volunteers aged 4-83 years
 Patrik Španěl, Kseniya Dryahina and David Smith
 Journal of Breath Research 1 (2007) 011001 (4pp)

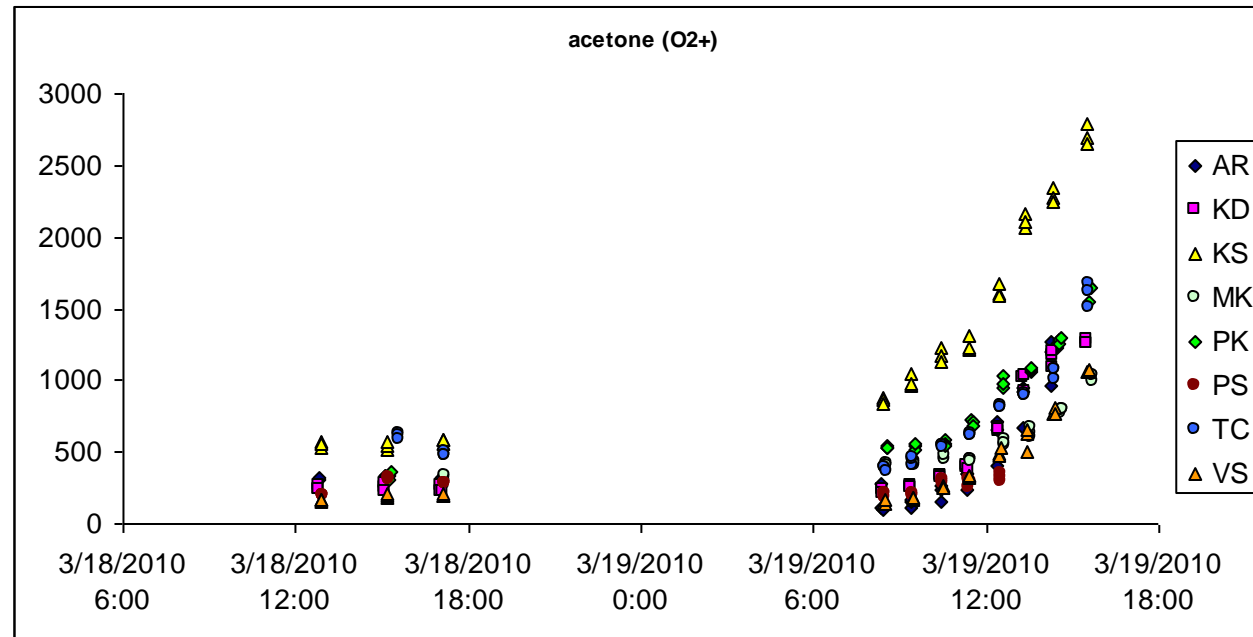
Ketogenní dieta

Zatím největší výzkum, který jsem dělala, byl celkem dost náročný nejen pro tělo ale i pro žaludek, kdy jsme zkoumali zvyšování acetonu v dechu při hladovění a pak při podávání ketogenního jídla po několik hodin. Překvapilo mě, že i přes ne zrovna lákající zadání tohoto experimentu se sešlo 8 dobrovolníků.

**Alžběta Rejšková, studentka septimy
Biskupské gymnázium, Žďár nad Sázavou**

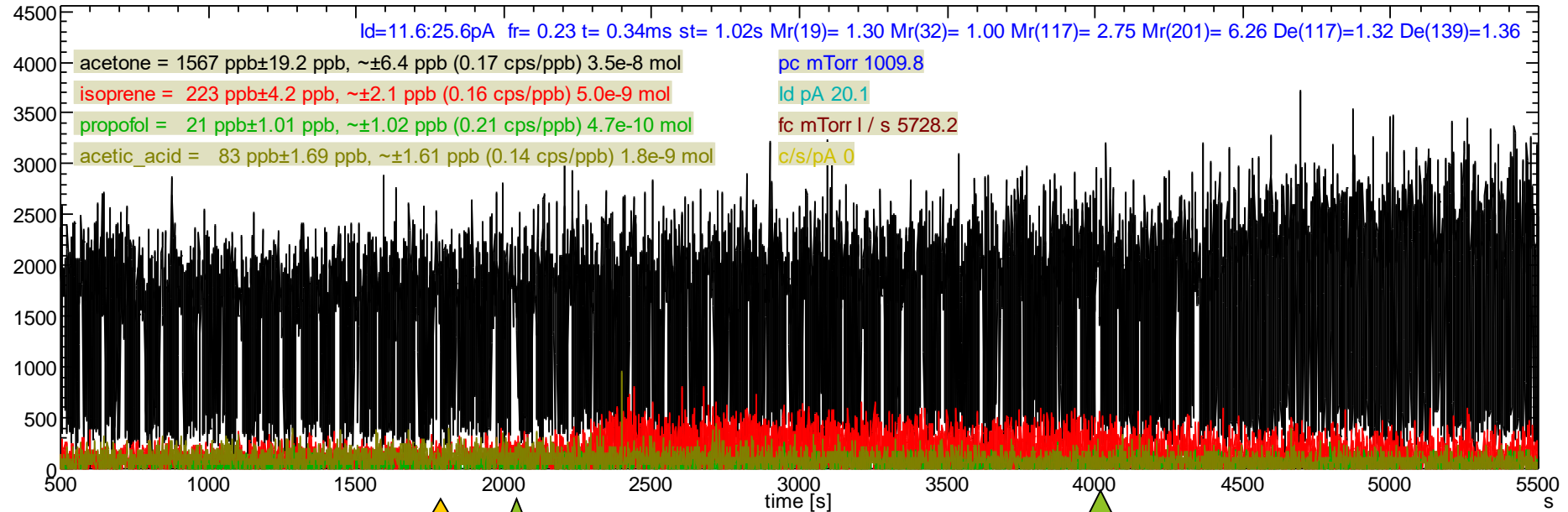


Věk	výška	váha	BMI	Šlehačka (g)
18	165	68	24.98	134
30	170	70	24.22	132
25	177	67	21.39	133
28	163	68	25.59	130
42	176	99	31.96	153
25	183	76	22.69	141
25	180	66	20.37	132
33	172	64	21.63	126

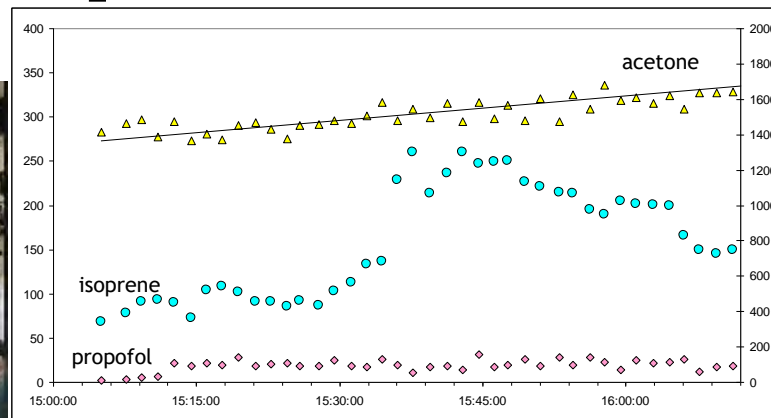


Intra-operative breath analysis using SIFT-MS

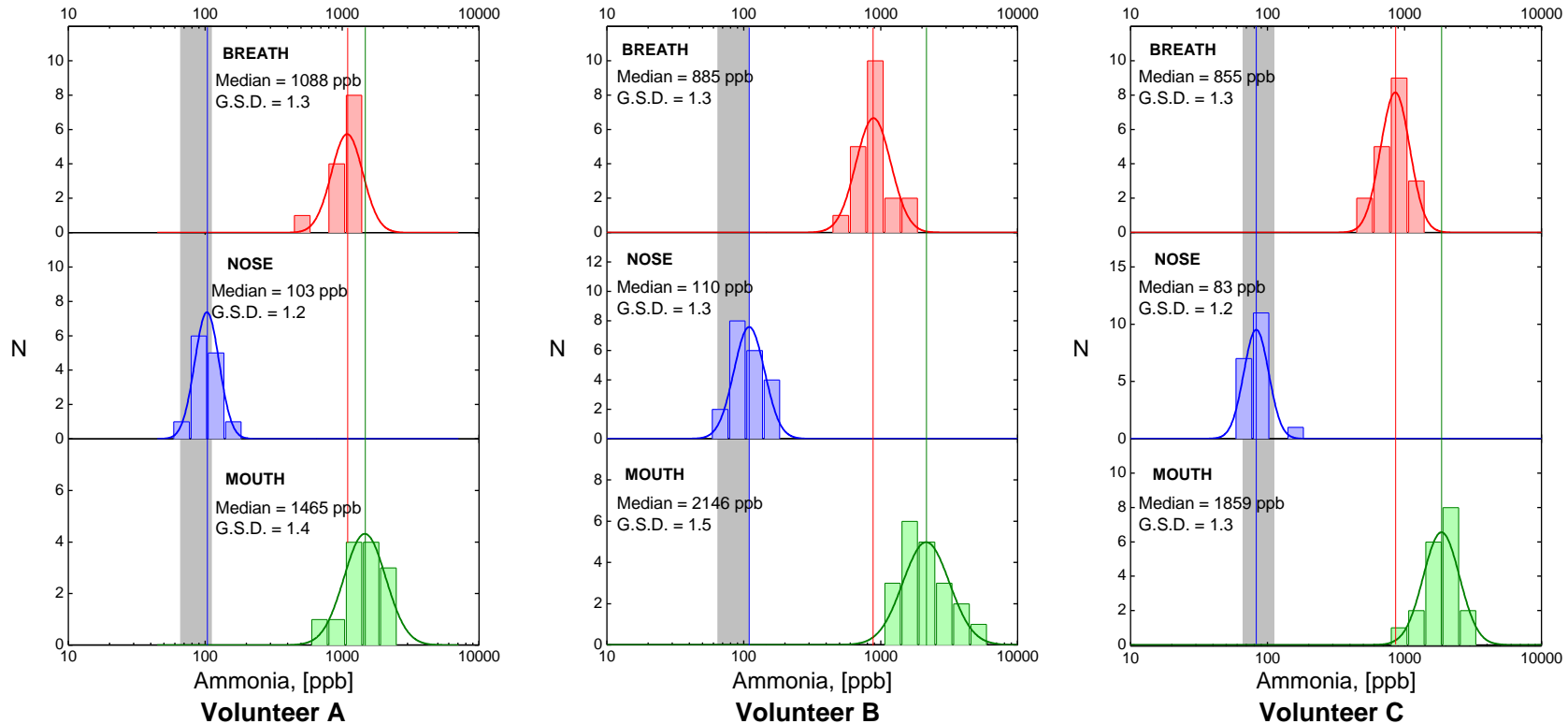
operation 1800, inflate 2200, biopsy 2500, another biopsy at 3200s, extracting the lymph node at 3400s, deflate 4100, endoscope 5700, disconnected 7600s, 100% O2 initially, p=1.01!



↑ Incision
↑ Inflation of abdominal cavity by CO₂ for laparoscopy
↑ Deflation of abdominal cavity after laparoscopy



Ammoniak, rozdíl ve výdechu ústy a nosem

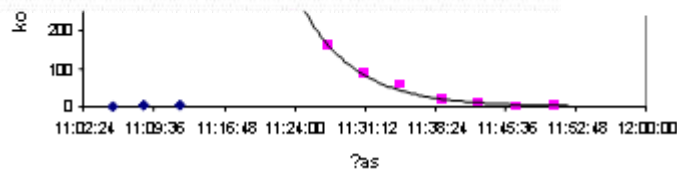
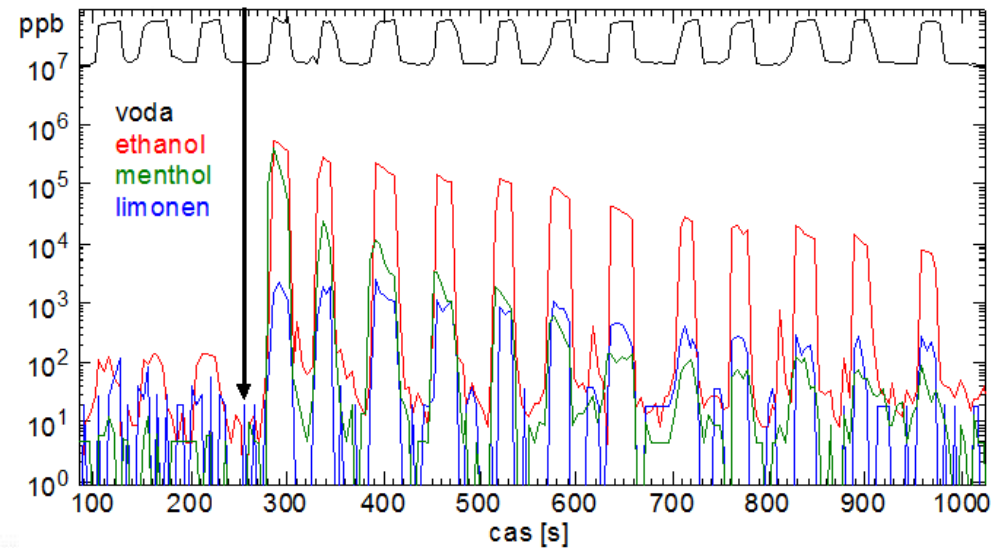
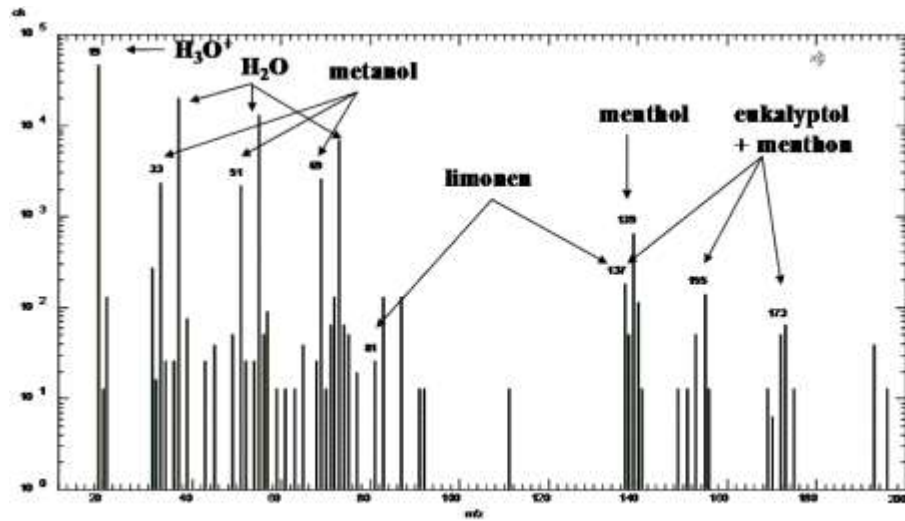


Ammonia in lab air: 91 ± 27 ppb

The intra-individual distributions of ammonia obtained from three healthy volunteers, A, B, C, measured in *mouth*-exhaled breath, *nose*-exhaled breath and in the closed mouth *cavity*.

Testování zubní pasty a ústní vody

Klára Píchová, Václav Šimánek, středoškolský projekt



- Pachové látky
- Aromat
- Změna v čase

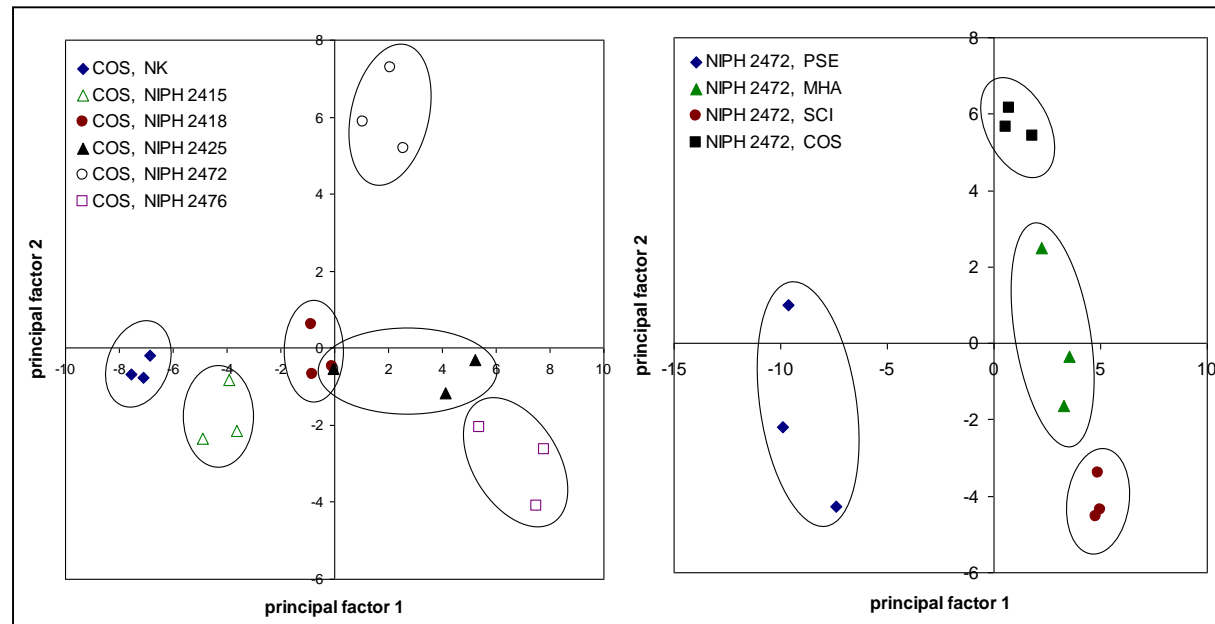
Bakteriální kultury

- ▶ Multivariační statistické metody
- ▶ PCA



Analýza hlavních komponent

- ▶ X m/z 18, 36 and 54
- ▶ Y m/z 28, 59 and 77



Měření kyanovodíku u dětí s cystickou fibrózou

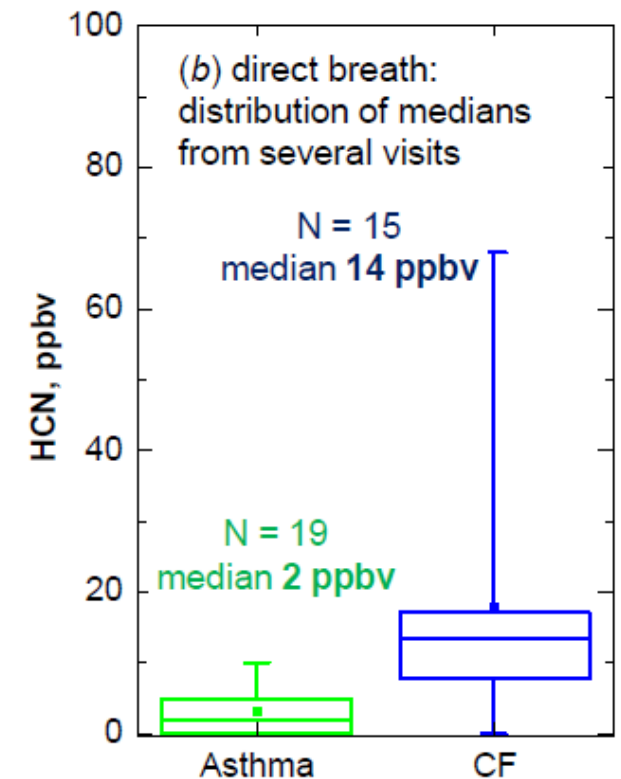
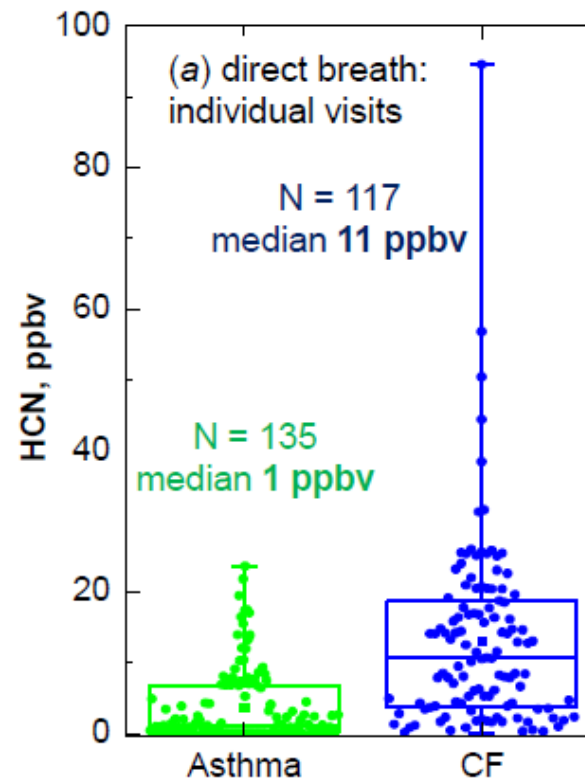
Cystická fibróza

Recesivní vrozené onemocnění způsobené mutací genu produkujícího protein CFTR u 1 ze 4000 dětí.

Příznaky: Vysoká koncentrace sodných a/nebo chloridových iontů v potu, časté (někdy trvalé) záněty dýchacího ústrojí způsobené bakteriemi - *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*.

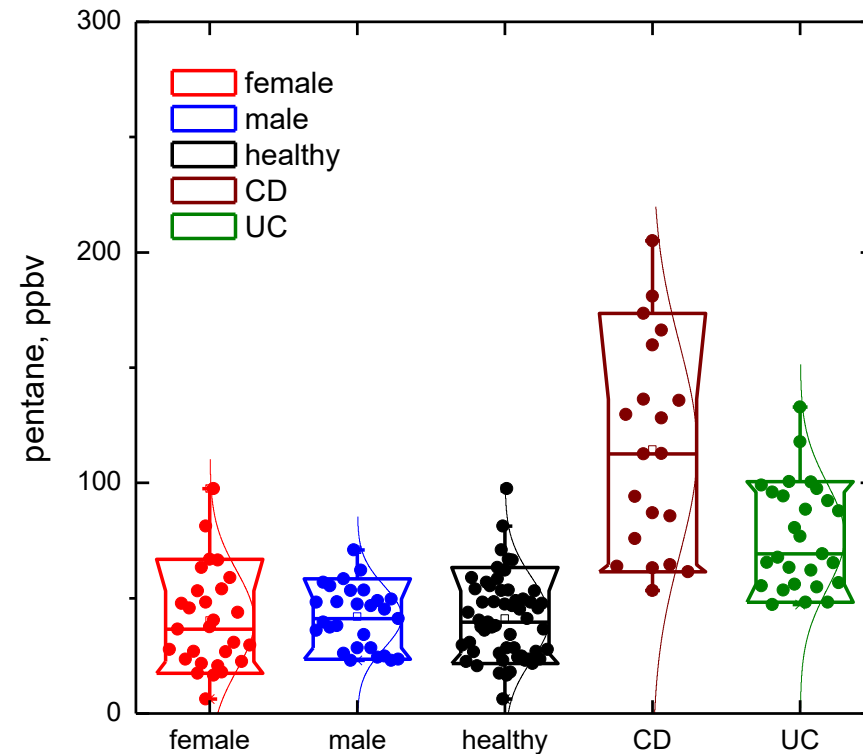
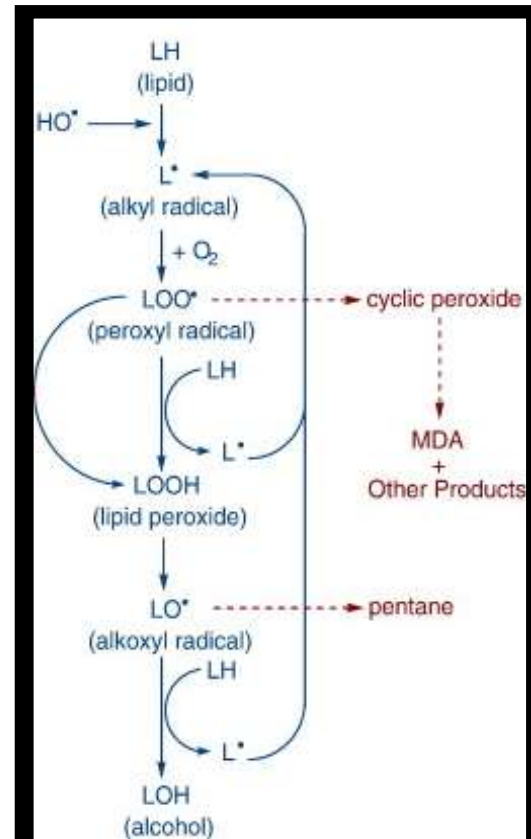
Pseudomonády jsou těžko léčitelné, neboť se obalí mikrofilmem a znemožní přístup antibiotikům. Dále se často objevují záněty slinivky, snížená mobilita trávicí trubice či cirhóza jater.

Léčba se soustředí zejména na terapii dýchacího ústrojí - fyzioterapie, antibiotika. 20. až 40. let života.



Idiopatické střevní choroby

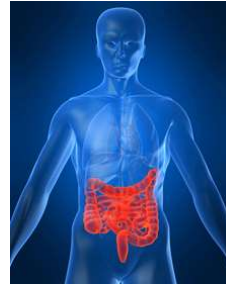
- ▶ Ulcerózní kolitída
- ▶ Crohnova nemoc
- ▶ Významné rozdíly u **pentanu**



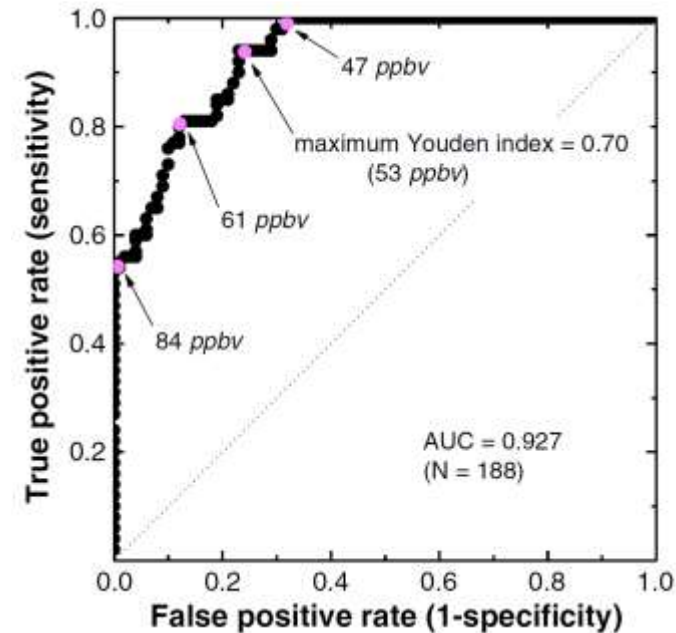
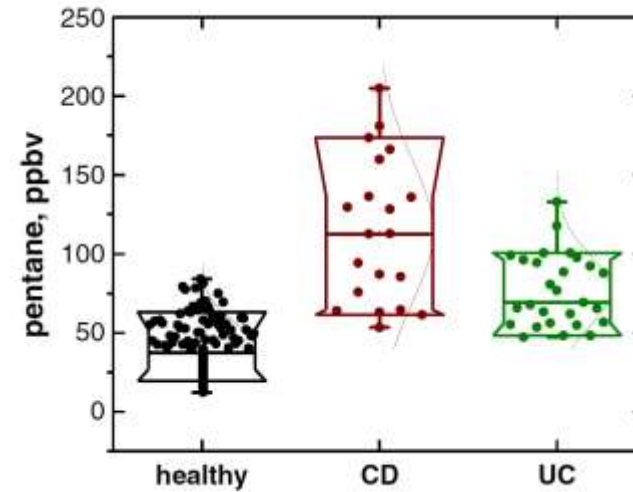
1-pentane: Inflammatory bowel disease

Inflammatory bowel disease (IBD)

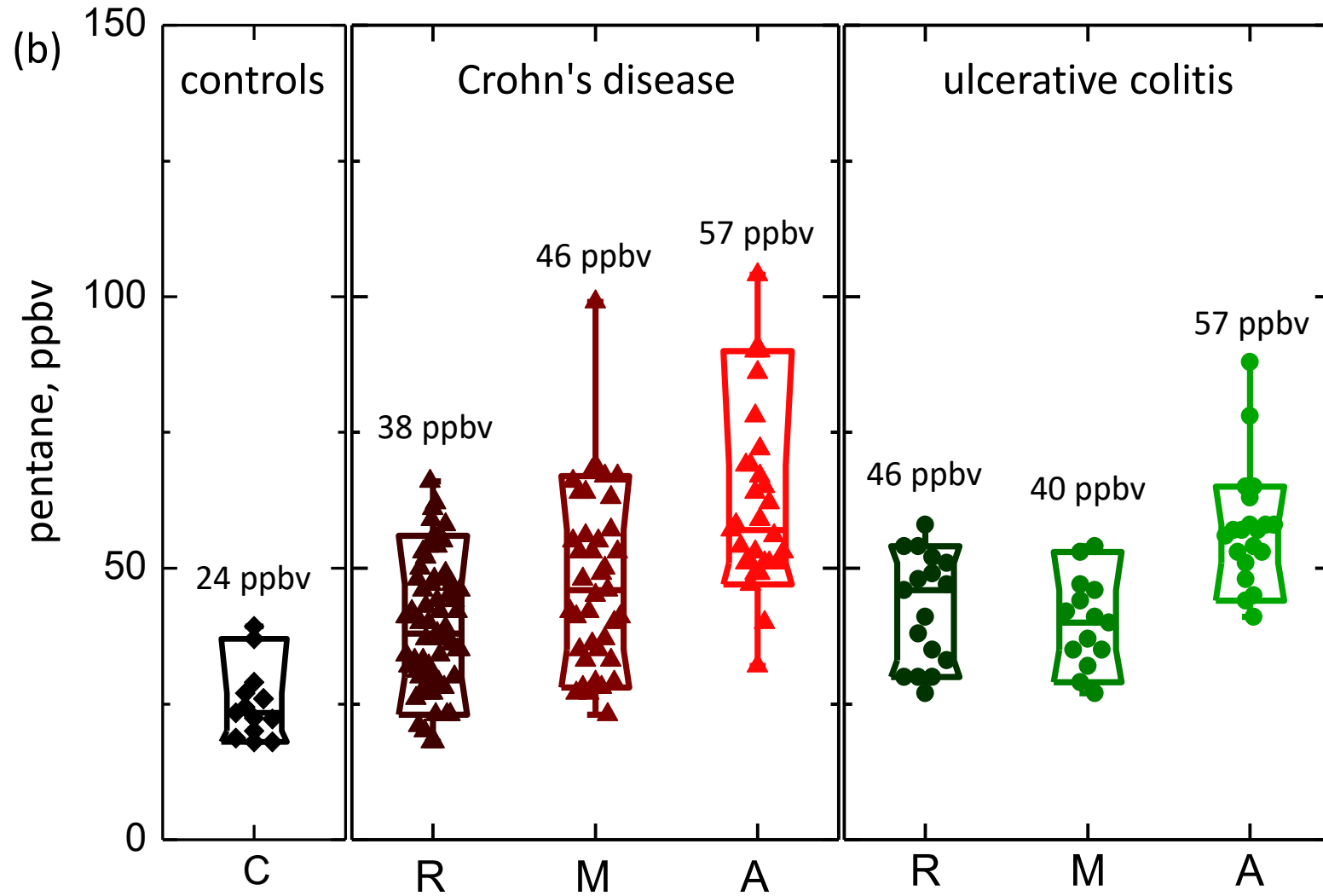
- The major types of IBD are **Crohn's disease (CD)** and **ulcerative colitis (UC)**.



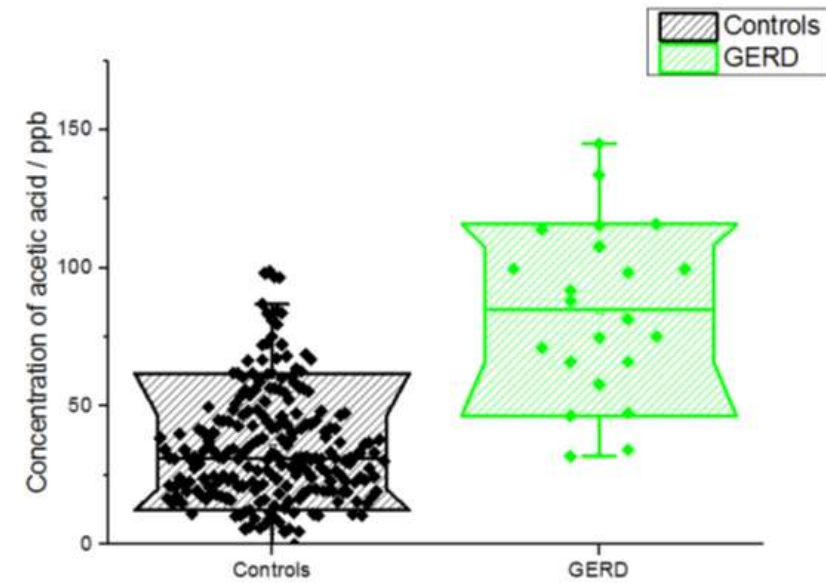
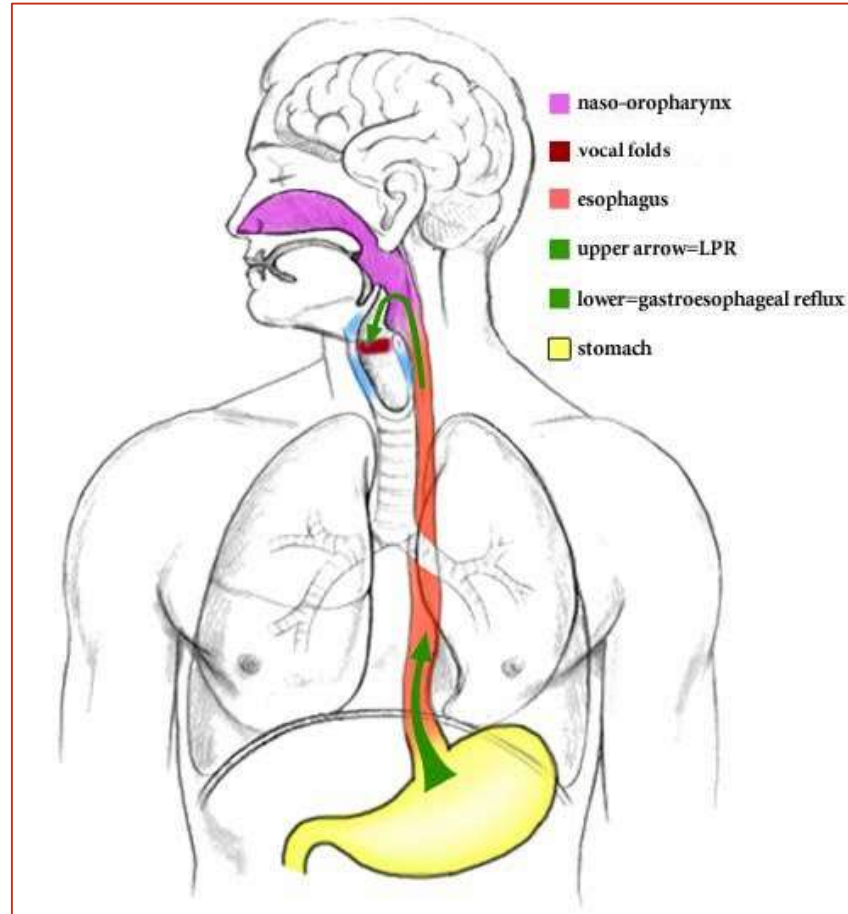
- a group of chronic disorders of the gastrointestinal tract causing extensive inflammation and damage to the intestines and rectum
- The actual cause of the disease is unclear, but all indications are that it is an autoimmune disease, genetic predisposition, environment and lifestyle play an important role.
- IBD primarily occurs in young people aged 20 to 30 years.



Pentan. Druhá klinická studie



GERD - reflux



Acetic acid: GERD and Cystic Fibrosis

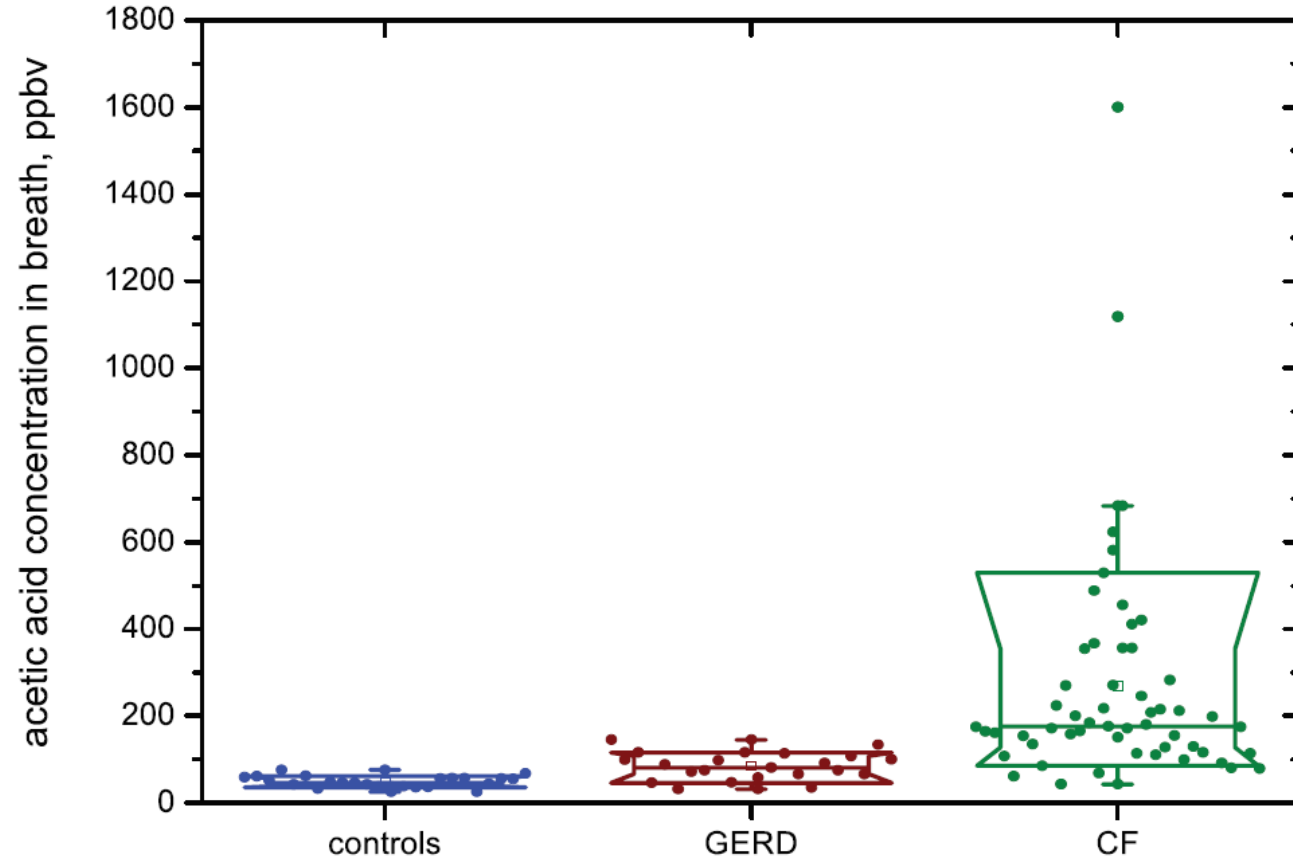
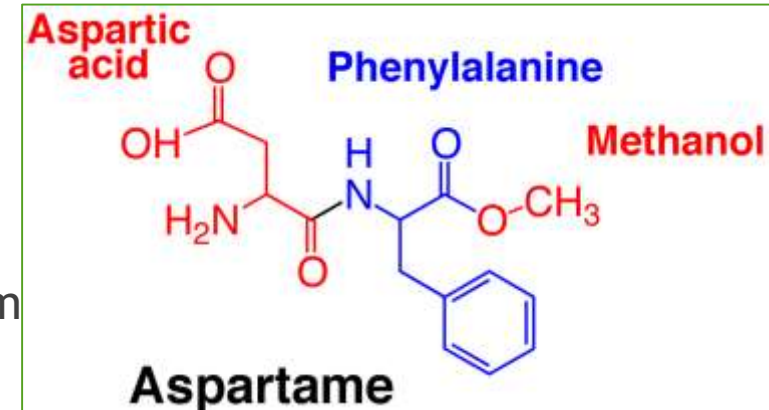


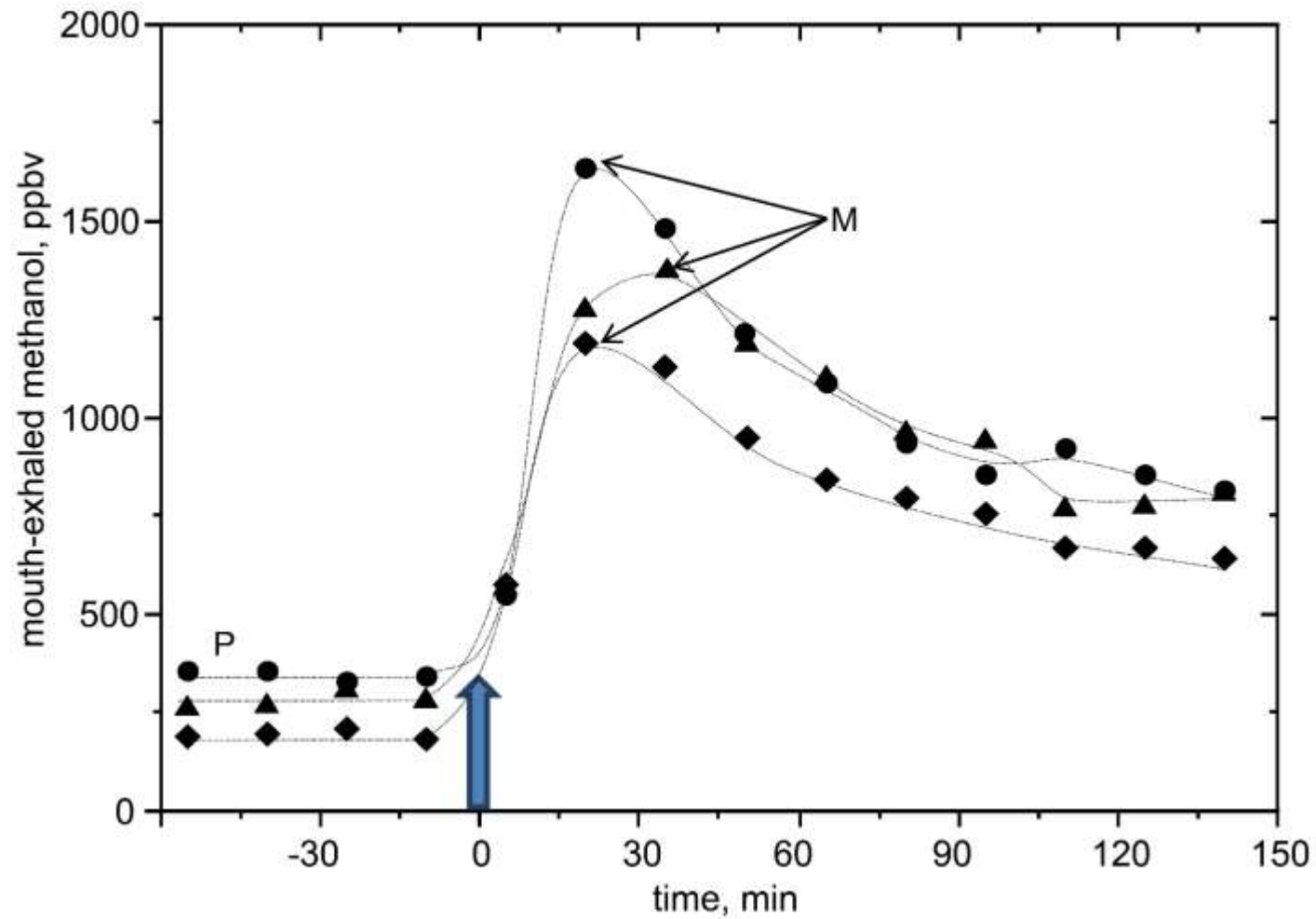
Figure 2. Concentrations of acetic acid in exhaled breath of healthy controls and patients with GERD (from [24]) and patients with CF obtained using SIFT-MS. In addition to the individual data points the box-and-whisker plots are included to indicate the 10th, 25th, 50th, 75th and 90th percentiles.

Aspartame

- ▶ The acceptable daily intake (ADI)
 - ▶ Europe: 40 mg/kg
 - ▶ United States: 50 mg/kg
- ▶ Aspartame must not be ingested by sufferers from phenylketonuria.
- ▶ Although declared safe at ADI or lower doses, connection has been suggested to diseases, including lymphomas and leukemia
- ▶ The aspartic acid component is connected to neurological disorders including migraine, seizures, epilepsy



Breath methanol kinetics after ingestion of aspartame



$$M - P = KV_d/V_{\text{TBW}}$$

TBW ~ 60% of body weight

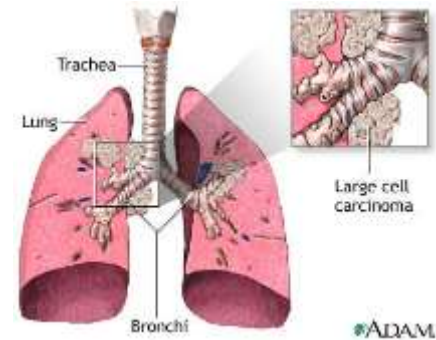
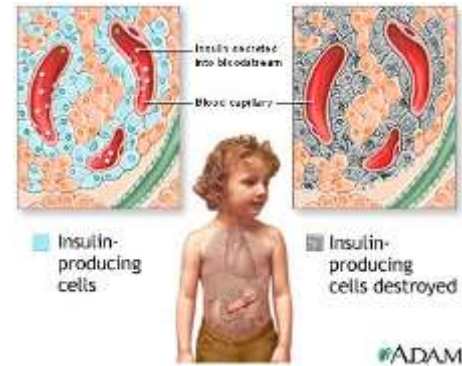
$$M - P = 1032 \text{ ppbv}$$



One-compartment model

Směry výzkumu možností analýzy dechu

- ▶ Fyziologie
- ▶ Diabetes
- ▶ Cystická fibróza
- ▶ Návykové látky
- ▶ Idiopatické střevní choroby
- ▶ Nádory



Další mezioborový výzkum

- ▶ Životní prostředí
- ▶ Bezpečnost (výbušniny)
- ▶ Potravinářství
- ▶ Iontová chemie (planetární atmosféry)



Vehicle Interior Air Quality



Ambient Air Monitoring



Container Safety



Semiconductor Manufacture



Mud Logging



Breath Research



Dynamic Processes in Food



Border Security



Research Solutions

Použití SIFT-MS

20,000 containers: 12% unsafe



Scan Results voice200r

Fumigant Analysis 11-11 16:33 Menu

ID 12572

formaldehyde	2.4 ppm	⬆
chloropicrin	<RT	
ethylene dibromide	<RT	
ethylene oxide	<RT	
hydrogen cyanide	<RT	
methyl bromide	<RT	
phosphine	<RT	
vikane	<RT	

Next

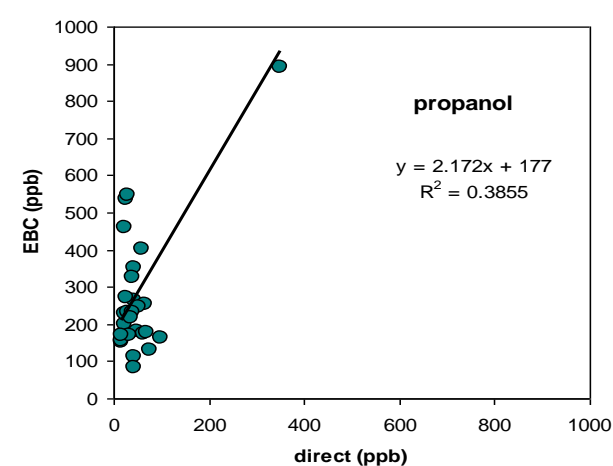
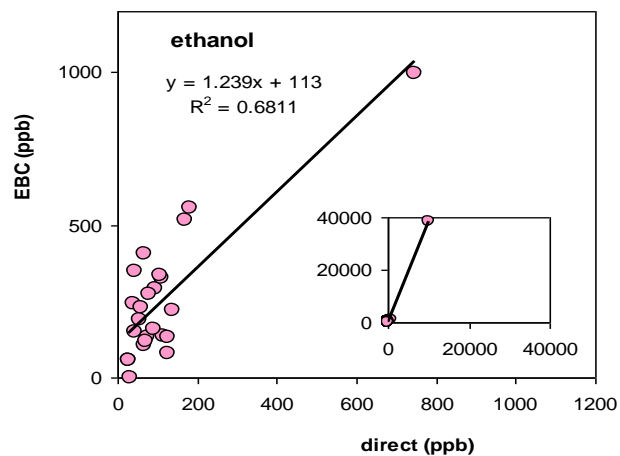
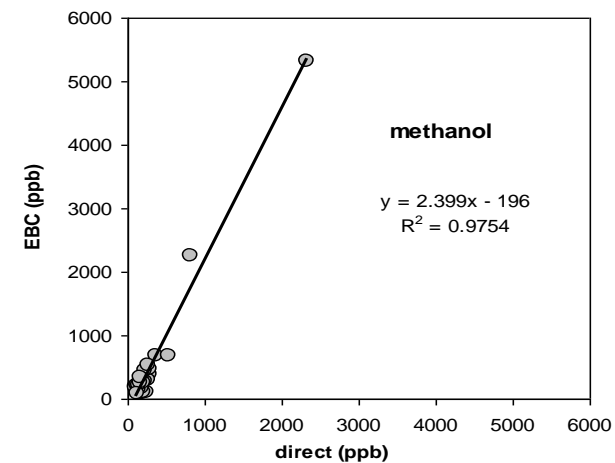
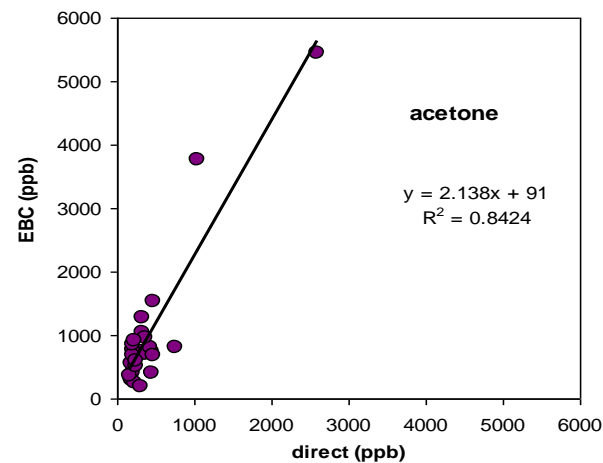
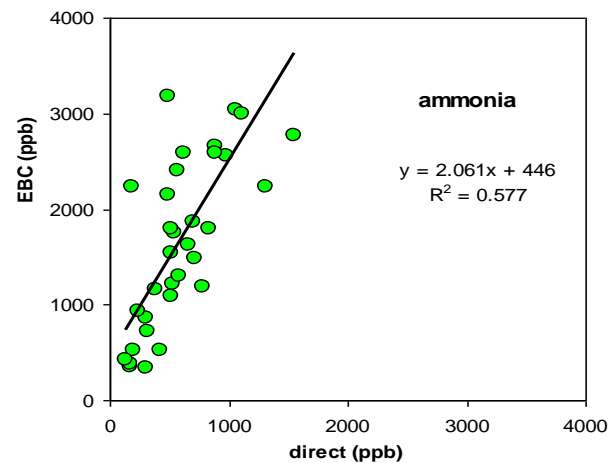


Fumigants and toxic compounds in containers

Volatile compounds in breath and EBC headspace

Petr Čáp¹, František Pehal¹, Kseniya Dryahina², Patrik Španěl²

Some compounds correlate well



Selected ion flow tube mass spectrometry of exhaled breath condensate headspace

Petr Čáp, Kseniya Dryahina, František Pehal and Patrik Španěl

Rapid Commun. Mass Spectrom. 22 (2008) 2844-2850