



## Измерение включения изотопной метки в выдыхаемый CO<sub>2</sub>

П.П. Золин, В.Д. Конвай

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», Омск

Контактная информация: Золин Петр Петрович, zolin\_petr@mail.ru

В работе описан простой дыхательный тест на крысах с использованием изотопа <sup>14</sup>C. После внутривенного введения <sup>14</sup>C-глюкозы углекислый газ, выдыхаемый в камере, собирали при помощи воздухозаборной системы с насосом. Уровень <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> в выдыхаемом воздухе измеряли в течение 30 мин через 10-минутные интервалы. Полученные данные свидетельствуют о том, что данный метод может применяться в медицинских и биологических исследованиях с использованием меченых веществ.

**Ключевые слова:** дыхательные тесты, изотопная метка, углекислый газ, глюкоза.

### Введение

Методы, связанные с использованием газоаналитического оборудования, находят в медико-биологических исследованиях все более широкое применение, прежде всего благодаря своей неинвазивности. Иногда объектом изучения является орган или кусочек (срез) ткани, но чаще такие исследования выполняются на целом организме человека или животного, когда анализируется выдыхаемый воздух.

В настоящее время известно, что в воздухе, выдыхаемом человеком и животными, может содержаться более 2000 разнообразных веществ [4, 9, 10, 14, 15, 18]; несколько десятков из них уже сейчас используется в эксперименте и в клинической диагностике в качестве биомаркеров, позволяющих судить о протекании физиологических и патологических процессов в организме.

Так, например, в ряде работ, выполненных на животных и людях, изучалась интенсивность процессов свободнорадикального окисления липидов, происходящих в организме, по содержанию в выдыхаемом воздухе различных алканов [4, 12, 13].

Еще более интересный пример. Считается, что молекулярный водород H<sub>2</sub> в животных тканях продуцируется только в процессе анаэробного метаболизма [14]. В состоянии покоя в организме здорового человека анаэробного обмена веществ не происходит, поэтому в выдыхаемом воздухе натошак H<sub>2</sub> должен отсутствовать; в случае же выделения H<sub>2</sub> через легкие в покое натошак его источником является жизнедеятельность анаэробных бактерий в кишечнике, что используется для диагностики ряда заболеваний [10, 14].

Кроме измерения количеств веществ в выдыхаемом воздухе, широко исследуется также включение в них изотопных меток, прежде всего углеродных, вводимых в составе метаболических предшественников: <sup>13</sup>C- или <sup>14</sup>C-глюкозы [16], <sup>13</sup>C- или <sup>14</sup>C-ксилозы [1, 5, 19], <sup>13</sup>C- или <sup>14</sup>C-лактозы [14], <sup>13</sup>C-фенилаланина [17], <sup>14</sup>C-лизина [11], <sup>13</sup>C-ацетата [21], <sup>13</sup>C-мочевины [7], <sup>13</sup>C- или <sup>14</sup>C-гликолевой кислоты [1, 5, 19], и т.д. При применении в качестве метки изотопов углерода (<sup>13</sup>C или <sup>14</sup>C) наиболее часто изучают включение метки в углекислый газ, реже – в другие компоненты выдыхаемого воздуха. Количество CO<sub>2</sub>, выделяемое организмом (выражаемое обычно в пересчете на единицу массы тела и на единицу времени дыхания), само по себе является рутинным показателем, но оно необходимо, чтобы вычислить удельную радиоактивность CO<sub>2</sub>, представляющую собой отношение включения радиоактивной метки в CO<sub>2</sub> к количеству CO<sub>2</sub>.

Согласно литературным данным, суммированным в работе [7], анализ состава выдыхаемого воздуха в реальном масштабе времени требует быстродействия измерений на уровне 0,1 с, анализ с усреднением по нескольким выдохам – около 5-10 с, анализ с накоплением пробы выдыхаемого воздуха и концентрированием – до 10-30 мин, анализ изотопного содержания выдыхаемого воздуха – 1-3 мин на исследуемую пробу. Отсюда следует, что одним из факторов, снижающих эффективность изучения выдыхаемого воздуха, является инерционность методов анализа, при оценке которой следует ориентироваться на вышеуказанные цифры и, кроме того, учитывать специфику исследования.

Инерционность изотопных исследований во многом определяется скоростью вовлечения в метаболизм введенного в организм меченого вещества и образования из него газообразных продуктов, выделяющихся через легкие. Кроме того, инерционность измерения всех компонентов выдыхаемого воздуха (меченых и немеченых) увеличивается из-за влияния приборного “мертвого” пространства, представляющего собой совокупный объем рабочих полостей аппаратуры, соединительных трубок и т.д. В начале сеанса измерения требуется некоторое время, зависящее от конструкции аппаратуры, в течение которого обычный атмосферный воздух в “мертвом” пространстве будет полностью вытеснен выдыхаемым воздухом. В дыхательных тестах на людях приходится пользоваться специальными приспособлениями и приемами, уменьшающими влияние “мертвого” пространства [16, 20]. При выполнении же работ на мелких лабораторных животных относительный объем “мертвого” пространства еще больше, чем при исследованиях на крупных животных и человеке, поскольку вместо использования маски или дыхательной трубки (мундштука) мелкое животное, как правило, сажают для измерений в дыхательную камеру, объем которой превышает размеры самого животного [17, 21].

Инерционность метода приводит к ложно заниженным результатам в начальном периоде измерения, так что эти начальные цифры обычно приходится отбрасывать до того временного периода, когда атмосферный воздух в “мертвом” пространстве будет полностью замещен выдыхаемым воздухом, и когда введенная в организм изотопная метка

в достаточной мере начнет включаться в  $\text{CO}_2$ . Но в некоторых видах исследований именно результаты начального периода представляют наибольшую ценность, поэтому актуальна разработка методических подходов, позволяющих уменьшить или устранить влияние инерционности измерений. Так, наши исследования постреанимационных метаболических нарушений [3, 22] показали, что в процессе реанимации следует как можно раньше вводить в организм изотопные метки для измерения их включения в продукты метаболизма, т.к. патологические сдвиги в самом раннем постреанимационном периоде очень интересны.

**Целью** настоящей работы является отработка на крысах метода измерения выделяемого ими  $\text{CO}_2$  и включения в  $\text{CO}_2$  изотопной метки, с учетом влияния инерционности анализа.

### **Материалы и методы**

Эксперименты выполнены на 29-ти нелинейных белых крысах-самцах массой 180-220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария ЦНИЛ ОмГМУ и получавших стандартный лабораторный рацион при свободном доступе к воде и пище в соответствии с нормами содержания [2]. Все опыты выполнены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными (European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation and other scientific purposes (ETS № 123, Strasbourg, 1986)).

Дизайн исследования включал применение плана параллельных групп и простой рандомизации. Известно, что

метод простой рандомизации в достаточной мере обеспечивает случайное разделение животных на группы, хотя и не приводит к равной численности групп [6]. Из 29-ти задействованных в опытах крыс 21 животное подвергли клинической смерти и реанимации. Для воспроизведения клинической смерти и постреанимационной болезни нами была избрана модель механической асфиксии: она технически не сложна и не сопряжена с использованием никаких, за исключением диэтилового эфира, фармакологических средств. При ее использовании моделируются нередко встречающиеся в клинической практике состояния: аспирация рвотных масс, спазм дыхательных путей, повешение, асфиксия новорожденных, утопление, внезапная остановка дыхания, попадание в бескислородную атмосферу и т.д.

Крыс, находящихся под легким эфирным наркозом, фиксировали в положении на спине, интубировали полиэтиленовой трубкой диаметром 2 мм. Трубку фиксировали к верхней губе и полость рта тампонировали увлажненной салфеткой. После установления ритмичного дыхания трубку перекрывали на 6,5 мин, после чего животное реанимировали при помощи непрямого массажа сердца и искусственного дыхания. Из подвергнутых асфиксии крыс ( $n=21$ ) 8 реанимировать не удалось, а 13 успешно реанимированных животных разделили на опытные группы: 1-ую (6 крыс) и 2-ую (7 крыс). Остальные 8 крыс составили контрольную группу: их подвергали не асфиксии, а лишь «контрольным» манипуляциям – наркозу, фиксации, интубации.

Животным 1-ой опытной группы сразу же после появления у них сердцебие-

ния в ходе реанимации в предварительно отпрепарированную бедренную вену вводили <sup>14</sup>C-глюкозу в дозе 740 кБк\*кг<sup>-1</sup>, растворенную в 0,9% NaCl, который брали из расчета 2,5 мл\*кг<sup>-1</sup> массы тела крысы. Животным 2-ой опытной группы вводили по вышеописанной схеме <sup>14</sup>C-глюкозу через 60 мин после реанимации, а крысам контрольной группы – сразу после проведения «контрольных» манипуляций. В течение 30 мин после введения <sup>14</sup>C-глюкозы у животных всех групп измеряли выделение легкими углекислого газа, а затем всех крыс забивали под эфирным наркозом для исследования включения изотопной метки в метаболиты внутренних органов.

Для измерения выделения крысами CO<sub>2</sub> и включения в него глюкозной метки животных всех групп сразу после введения <sup>14</sup>C-глюкозы помещали в герметически закрываемую стеклянную дыхательную камеру объемом 1 л, через входную трубку в которую подавался воздух, очищенный от атмосферного CO<sub>2</sub> пропусканием через насыщенный р-р NaOH и освобожденный от следов NaOH продуванием через марлевый тампон. Эффективность очистки поступающего в камеру воздуха от атмосферного CO<sub>2</sub> проверяли, поместив в воздухопроводную систему перед камерой контрольную склянку с р-ром Ва(ОН)<sub>2</sub>. При пропускании через нее воздуха даже в течение 1 ч р-р не должен мутнеть: это доказывает, что воздух, поступающий в камеру, полностью очищен от CO<sub>2</sub>. Освобождение атмосферного воздуха от CO<sub>2</sub> необходимо для стандартизации дыхательного теста, поскольку содержание в воздухе CO<sub>2</sub> может существенно различаться в разных помещениях и в разные дни.

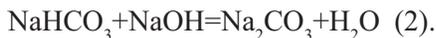
Выходная трубка располагалась с противоположной стороны дыхательной камеры от места подачи воздуха через входную трубку. Выходящий из камеры с крысой воздух, содержащий выдыхаемый ею углекислый газ, пропускали с целью его улавливания через 30 мл 10% р-ра NaOH, залитого в три последовательно соединенные сосуда Дрекселя (по 10 мл в каждом) с внутренним диаметром 1,5 см. Прокачивание воздуха через описанную систему осуществлялось насосом “Unipan 335 A” со скоростью 80 мл\*мин<sup>-1</sup>. Эта скорость, а также время нахождения крысы в дыхательной камере, объем и концентрации р-ров были определены нами в отдельной серии пробных измерений, выполненных на здоровых крысах. Дистиллированную воду, на которой готовили р-ры NaOH, предварительно освобождали от растворенного атмосферного CO<sub>2</sub> кипячением в течение 40 мин.

Через 10 мин, а затем через 20 мин после посадки крысы в дыхательную камеру 10% р-р NaOH, залитый по 10 мл в три последовательно соединенные сосуда Дрекселя, заменяли на свежий. Таким образом, получали три периода измерения: 0-10, 10-20 и 20-30 мин после посадки крысы в дыхательную камеру.

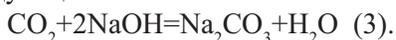
Р-р NaOH после каждого 10-минутного периода улавливания CO<sub>2</sub> сливали из трех сосудов Дрекселя в стеклянные флаконы объемом 30 мл, так что уровень жидкости доходил до пробки, и воздуха над жидкостью практически не было. Флаконы хранили при комнатной температуре для определения количества CO<sub>2</sub> и включения в CO<sub>2</sub> изотопной метки.

При пропускании CO<sub>2</sub> через р-р NaOH протекают реакции:



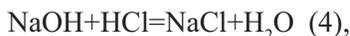


Суммарное уравнение этих реакций следующее:



Таким образом, соотношение между  $\text{CO}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – эквимолярное.

Для определения количества  $\text{CO}_2$ , выдыхаемого крысами, из 30 мл 10% р-ра  $\text{NaOH}$ , слитого из сосудов Дрекселя, отбирали аликвоты по 2 мл и титровали на рН-метре р-рами  $\text{HCl}$ . На первом этапе методики титрование проводили сначала 2М-ным, затем 0,025 М-ным р-рами  $\text{HCl}$  до рН 8,35. При этом титруется весь  $\text{NaOH}$ , содержащийся в пробе, по уравнению:



и половинное количество  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , содержащегося в пробе, по уравнению:



Объем  $\text{HCl}$ , пошедший на титрование на первом этапе, и ее концентрацию можно не учитывать (они не нужны для расчетов).

На втором этапе методики титруется оставшееся половинное количество  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , содержащееся в пробе, по уравнению:



Это состояние достигается при рН=3,9. Для титрования в данном случае используется 0,025 М-ная  $\text{HCl}$ ; ее объем, пошедший на титрование (в мл), протоколируется и используется для расчетов.

Количество выделенного крысой  $\text{CO}_2$  рассчитывали по формуле:

$$Q\text{CO}_2 = V * 25 * 2 * 15 / m * 600 \quad (7),$$

где: V – объем 0,025 М-ной  $\text{HCl}$ , пошедший на титрование, в мл;

25 – количество мкмоль  $\text{NaHCO}_3$ , титруемое одним миллилитром 0,025 М-ной  $\text{HCl}$ : поскольку в 1 мл 0,025 М-

ной  $\text{HCl}$  содержится 25 мкмоль  $\text{HCl}$ , а соотношение между  $\text{HCl}$  и  $\text{NaHCO}_3$  – эквимолярное (уравнение 6), то 1 мл 0,025 М-ной  $\text{HCl}$  будет расходоваться на 25 мкмоль  $\text{NaHCO}_3$ ;

2 – коэффициент пересчета количества  $\text{NaHCO}_3$  в количество  $\text{CO}_2$ : поскольку соотношение между количествами  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  равно 1:2 (уравнения 5 и 6), а соотношение между  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{CO}_2$  – эквимолярное (уравнение 3), то соотношение между количествами  $\text{NaHCO}_3$  и  $\text{CO}_2$  равно 1:2;

15 – коэффициент пересчета на полный объем  $\text{NaOH}$  с поглощенным углекислым газом в трех сосудах Дрекселя, поскольку титровали 2 мл из 30 мл;

m – масса крысы, выраженная в кг;

600 – время нахождения крысы в дыхательной камере, выраженное в секундах (с).

После сокращений в формуле 7 получаем итоговую формулу:

$$Q\text{CO}_2 = 1,25 * V / m \quad (8).$$

Выделение крысами углекислого газа  $Q\text{CO}_2$ , полученное по формуле 8, выражается в мкмоль  $\text{CO}_2 * \text{с}^{-1} * \text{кг}^{-1}$  массы тела крысы, где секунды означают время нахождения крысы в дыхательной камере.

Для определения радиоактивности углекислого газа, выдыхаемого крысами после введения им  $^{14}\text{C}$ -глюкозы, из 30 мл 10% р-ра  $\text{NaOH}$ , слитого из сосудов Дрекселя, отбирали аликвоты по 2 мл, нейтрализовали насыщенным р-ром лимонной кислоты до рН=7, и 0,2 мл нейтрализованного р-ра смешивали с 10 мл сцинтиллятора Брея. Радиоактивность измеряли методом жидкостной сцинтилляционной радиометрии в счетчике СБС-2 при времени счета 120 с. Результаты включения метки в  $\text{CO}_2$  выражали в  $\text{имп} * \text{с}^{-1} * \text{кг}^{-1}$  массы

тела крысы, где секунды означают время счета пробы в счетчике радиоактивности (а не время нахождения крысы в дыхательной камере).

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0 («StatSoft Inc.», США): для каждой группы вычисляли среднюю арифметическую и ошибку средней.

### Результаты и их обсуждение

Выделение углекислого газа (QCO<sub>2</sub>) крысами контрольной группы в течение 0-10 мин, 10-20 и 20-30 мин после посадки крыс в дыхательную камеру составило соответственно: 15,9±1,1; 22,1±0,9 и 28,4±1,1 мкмоль CO<sub>2</sub>\*с<sup>-1</sup>\*кг<sup>-1</sup> массы тела крыс (здесь и далее приводятся средняя арифметическая ± ошибка средней). Включение <sup>14</sup>C-глюкозы в CO<sub>2</sub> в течение 0-10 мин, 10-20 и 20-30 мин после посадки крыс в дыхательную камеру равнялось в контрольной группе соответственно 444±120, 1066±172 и 1566±257 имп\*с<sup>-1</sup>\*кг<sup>-1</sup> массы тела.

Из приведенных цифровых данных видно, что оба изучаемых нами показателя с течением времени измерения нарастают и достигают максимума в интервал времени 20-30 мин. Мы приняли этот максимальный уровень за 100%, чтобы сравнить между собой динамику нарастания двух изучаемых показателей: оказалось, что выделение CO<sub>2</sub> крысами контрольной группы в периоды 0-10 мин, 10-20 и 20-30 мин после посадки крыс в дыхательную камеру равно в среднем 56%, 78% и 100% соответственно, а включение <sup>14</sup>C-глюкозы в CO<sub>2</sub> – соответственно, 28%, 68% и 100%.

Обращает на себя внимание отставание второго показателя от первого в

течение периода 10-20 мин и, особенно, в период 0-10 мин после начала измерений. Причина выявленного отставания, как мы полагаем, заключается в следующем.

Величина QCO<sub>2</sub> нарастает в интервалы времени 0-10 мин и 10-20 мин из-за вытеснения обычного атмосферного воздуха в измерительной системе выдыхаемым воздухом – это инерционность измерений, обусловленная приборным “мертвым” пространством. Благодаря тому, что за первые 20 мин нахождения крысы в дыхательной камере заполнение ее выдыхаемым воздухом завершается, выделение CO<sub>2</sub> в последующие интервалы времени зависит уже не от инерционности метода, а только от интенсивности обмена веществ: QCO<sub>2</sub> определяется суммарным образованием CO<sub>2</sub> во всех реакциях декарбоксилирования в организме за вычетом суммарного потребления в метаболизме некоторой части образовавшегося CO<sub>2</sub>. Известно, что наибольшее количество CO<sub>2</sub> образуется в реакциях окислительного декарбоксилирования, катализируемых изоцитратдегидрогеназой и α-кетоглутаратдегидрогеназным комплексом цикла трикарбоновых кислот, а также пируватдегидрогеназным комплексом. Цикл трикарбоновых кислот, являющийся общим конечным этапом катаболизма углеводов, липидов и белков, генерирует примерно две трети всего CO<sub>2</sub>, образующегося в организме [8].

А на включение <sup>14</sup>C-глюкозы в CO<sub>2</sub>, во-первых, влияет точно так же, как и на QCO<sub>2</sub>, “мертвое” пространство измерительной системы, а, во-вторых, на него дополнительно влияет скорость вовлечения в метаболизм внутривенно введенной меченой глюкозы. Молеку-

лам  $^{14}\text{C}$ -глюкозы требуется время, чтобы проникнуть из кровеносного русла внутрь клеток, затем большая часть этих молекул постепенно превращается в  $^{14}\text{CO}_2$  в реакциях гексозобисфосфатного и гексозомонофосфатного путей метаболизма. Наиболее интенсивно гексозомонофосфатный цикл протекает в эритроцитах, клетках печени, жировой ткани, надпочечников и половых желез; но даже в перечисленных клетках на долю гексозомонофосфатного пути приходится не более 25-30% от всего количества метаболизируемой в них глюкозы, а остальная глюкоза во всем организме окисляется преимущественно в гексозобисфосфатном пути [8]. Небольшая часть  $^{14}\text{C}$ -глюкозы и ее метаболитов, не окислившись сразу до  $^{14}\text{CO}_2$ , вовлекается в более долгие превращения через гликоген, липиды, пентозы, белки и т.д.

Допустимая величина инерционности изотопных исследований определяется тематикой и задачами выполняемой работы, от них же зависит и способ введения метки в организм. Например, в работе по диетологии [17], чтобы исключить влияние инерционности, начинали собирать выдыхаемый воздух для измерения включения изотопной метки в  $\text{CO}_2$  только через 30 мин после орального введения крысе метки и посадки ее в дыхательную камеру. Т.е. первые 30 мин после введения изотопной метки тратились только на то, чтобы заполнить “мертвое” пространство измерительной системы выдыхаемым воздухом, а выделение крысой  $\text{CO}_2$  в этот период не учитывалось. Однако в реаниматологии крайне важен начальный временной период после клинической смерти. Наши предыдущие работы [3, 22], выполнен-

ные на такой же модели, что и сейчас (6,5-минутная асфиксия и реанимация у крыс), показали, что именно в первые 30 мин постреанимационного периода можно ожидать выраженных изменений показателей энергетического обмена. Поэтому необходимо было скорректировать влияние инерционности измерений на результаты нашего исследования.

Способы борьбы с влиянием инерционности в исследованиях выдыхаемого воздуха можно разделить на две группы: 1 – технические (физические) и 2 – математические.

К первой группе относится способ снижения инерционности метода путем увеличения скорости пропускания воздуха через систему. Нам таким образом удавалось ускорить на несколько минут время полного вытеснения атмосферного воздуха в измерительной системе выдыхаемым воздухом. В работе [21] подробно изучено влияние трех скоростей прокачивания воздуха через дыхательную камеру (75, 150 и 300 мл\*мин<sup>-1</sup>) на включение метки в  $\text{CO}_2$ . Однако мы отказались от увеличения скорости прокачивания, поскольку быстрое движение воздуха через дыхательную камеру само по себе является стресс-фактором для животного, способным повлиять на результаты, причем оно может влиять по-разному на контрольную крысу и на крысу, недавно реанимированную, которая еще слабо реагирует на внешние воздействия. Еще один технический способ заключается в том, чтобы уменьшить объем “мертвого” пространства, – например, посадку животного в дыхательную камеру заменить его интубацией. Но длительное присутствие интубационной трубки в трахее может нарушить физиологичность дыхания,

а также привести к отеку слизистой. Можно изменить режим введения животному <sup>14</sup>C-глюкозы, применив вместо болюсной инъекции непрерывную инфузию, но это также не является радикальным решением проблемы инерционности. Таким образом, технические способы борьбы с влиянием инерционности измерений чреваты усложнением методики и недостаточно эффективны.

Математические способы позволяют, не уменьшая физически “мертвое” пространство и другие слагаемые инерционности метода, скорректировать их влияние на конечный результат. Тем самым уменьшается систематическая ошибка, порождаемая растянутостью во времени процесса вовлечения <sup>14</sup>C-глюкозы в метаболизм и обновления воздуха в газоаналитической системе. Этот подход помогает устранять и другие систематические ошибки, в частности, ошибку, связанную с тем, что животное при посадке в дыхательную камеру испытывает стресс (что может влиять на изучаемые показатели в начале измерений) и лишь через некоторое время успокаивается.

Наличие большого количества (порядка 10-20) интервалов времени в процессе измерения включения метки в CO<sub>2</sub> дает возможность установить вид математической зависимости изучаемых показателей от времени [11, 16, 20, 21]. Получив таким образом математическое описание влияния инерционности на изучаемые показатели для контрольной группы, можно затем использовать его для корректировки результатов опытных групп. Но, как констатирует Е.В. Степанов [7], в настоящее время при исследованиях выдыхаемого воздуха ни один из существующих методических подходов не

может обеспечить всей совокупности необходимых аналитических характеристик, поэтому на практике для повышения, например, чувствительности анализа приходится жертвовать другими характеристиками – как правило, быстродействием и/или точностью. Мы не могли разделить процесс улавливания CO<sub>2</sub> на множество коротких интервалов времени, т.е. увеличить быстродействие анализа, поскольку при имеющейся чувствительности метода необходимо время порядка 10 мин, чтобы накопилось достаточное количество <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> для измерения его радиоактивности с приемлемой точностью. В итоге у нас оказалось всего три интервала времени, и мы применили простой способ корректировки влияния инерционности: для каждой крысы контрольной группы значение изучаемого показателя за интервал времени 0-30 мин после посадки в дыхательную камеру делили на значение этого показателя за интервалы 0-10 мин, 10-20 и 20-30 мин, и на полученные поправочные коэффициенты умножали результаты реанимированных животных из 1-ой и 2-ой опытных групп, полученные в те же интервалы времени.

Скорректированные результаты в 1-ой опытной группе (6 крыс), сформированной сразу после клинической смерти и реанимации, имеют следующую динамику: после посадки крыс в дыхательную камеру в первые 0-10 мин QCO<sub>2</sub> равно 13,1±1,0; в период 10-20 мин – 9,9±1,0; в период 20-30 мин – 12,6±1,9 мкмоль CO<sub>2</sub>\*с<sup>-1</sup>\*кг<sup>-1</sup> массы крысы. Включение <sup>14</sup>C-глюкозы в CO<sub>2</sub> в те же интервалы времени составляло соответственно 113±28; 129±24 и 284±56 имп\*с<sup>-1</sup>\*кг<sup>-1</sup> массы крысы.

В 2-ой опытной группе, где измерения начинали через 60 мин после реанимации, до этого момента не дожила одна крыса из семи, таким образом, выборка состояла из шести животных. В этой группе величина  $\text{QCO}_2$  в первые 10 мин после посадки крыс в дыхательную камеру составила  $26,4 \pm 2,7$ ; в период 10-20 мин –  $28,8 \pm 2,7$ ; в период 20-30 мин –  $21,1 \pm 1,3$   $\text{мкмоль CO}_2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$  массы крысы. Включение  $^{14}\text{C}$ -глюкозы в  $\text{CO}_2$  в указанные временные промежутки равнялось соответственно  $1363 \pm 275$ ;  $1399 \pm 372$  и  $1009 \pm 177$   $\text{имп} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1}$  массы крысы.

Из приведенных данных видно, что, как мы и ожидали, в первые 30 мин после реанимации происходят более выраженные изменения обоих изучавшихся показателей, чем спустя час-полтора. Детальная биохимическая интерпретация полученных результатов выходит за рамки настоящей работы, поскольку предполагает сопоставление включения  $^{14}\text{C}$ -глюкозы в  $\text{CO}_2$  с ее включением в липиды, гликоген и другие метаболиты внутренних органов.

Описанные нами методические приемы могут быть использованы при изучении различных показателей выдыхаемого воздуха, прежде всего – для измерения включения изотопных меток в  $\text{CO}_2$ .

### Выводы

1. Оработана методика измерения количества выделенного крысами  $\text{CO}_2$  и включения в  $\text{CO}_2$  изотопной метки из  $^{14}\text{C}$ -глюкозы.

2. С целью корректировки влияния инерционности на результаты измерений цифровые данные контрольной группы были использованы для вычи-

сления поправочных коэффициентов, на которые затем умножались данные опытных групп. Это позволило получить результаты измерений изучаемых показателей, начиная с самого первого интервала времени после введения крысам изотопной метки и посадки в дыхательную камеру.

### Список литературы

1. *Денисенко Т.Л., Перфилова К.М., Неумоина Н.В., Шутова И.В., Неумоина М.В., Ефимова Е.И.* Диагностика СИБР у больных хеликобактер-ассоциированной гастродуоденальной патологией // Вестник ННГУ. 2012. № 2-3. С. 41-44.
2. *Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В.* Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. - Киев: Вища школа. 1983. 383 с.
3. *Золин П.П., Лебедев В.М., Конвай В.Д.* Математическое моделирование биохимических процессов с применением регрессионного анализа: монография. - Омск: Изд-во Омского гос. ун-та. 2009. 344 с.
4. *Копылов Ф.Ю., Сыркин А.Л., Чомахидзе П.Ш., Быкова А.А., Шалтаева Ю.Р., Беляков В.В., Першенков В.С., Самотаев Н.Н., Головин А.В., Васильев В.К., Малкин Е.К., Громов Е.А., Иванов И.А., Липатов Д.Ю., Яковлев Д.Ю.* Перспективы диагностики различных заболеваний по составу выдыхаемого воздуха // Клиническая медицина. 2013. № 10. С. 16-21.
5. *Немцов Л.М.* Синдром избыточного бактериального роста: актуальные вопросы диагностики и менеджмента // Вестник ВГМУ. 2015. Т. 14. № 2. С. 5-15.
6. *Сергиенко В.И., Бондарева И.Б.* Математическая статистика в клинических исследованиях. - М.: ГЭОТАР-Медиа. 2006. 304 с.
7. *Степанов Е.В.* Методы высокочувствительного газового анализа молекул-биомаркеров в исследованиях выдыхаемого воздуха // Труды ИОФАН. 2005. Т. 61. С. 5-47.
8. *Щербак И.Г.* Биологическая химия. - СПб: Изд-во СПбГМУ. 2005. 480 с.
9. *Saio W., Duan Y.* Breath analysis: potential for clinical diagnosis and exposure assessment // Clin. Chem. 2006. V. 52. P. 800-811.

10. Eisenmann A., Amann A., Said M., Datta B., Ledochowski M. Implementation and interpretation of hydrogen breath tests // J. Breath Res. 2008. V. 2. No. 4. 046002 (9 pp) doi:10.1088/1752-7155/2/4/046002. Epub 2008 Jul 24. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1752-7155/2/4/046002/pdf>.
11. Gahl M.J., Benevenga N.J., Crenshaw T.D. Rates of lysine catabolism are inversely related to rates of protein synthesis when measured concurrently in adult female rats induced to grow at different rates // J. Nutr. 1998. V. 128. No. 9. P. 1503-1511.
12. Kivits G.A.A., Ganguli-Swarttouw M.A.C.R., Christ E.J. The composition of alkanes in exhaled air of rats as a result of lipid peroxidation *in vivo*. Effects of dietary fatty acids, vitamin E and selenium // Biochim. Biophys. Acta. 1981. V. 665. No. 3. P. 559-570.
13. Kneepkens C.M., Lepage G., Roy C.C. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation // Free Radic. Biol. Med. 1994. V. 17. No. 2. P. 127-160.
14. Ledochowski M. Hydrogen breath tests. - Innsbruck: Verlag Ledochowski, 2008. 64 p.
15. Miekisch W., Schubert J.K., Noeldge-Schomburg G.F. Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds // Clin. Chim. Acta. 2004. V. 347. P. 25-39.
16. Moseley L., Jentjens R.L.P.G., Waring R.H., Harris R.M., Harding L.K., Jeukendrup A.E. Measurement of exogenous carbohydrate oxidation: a comparison of [U-14C]glucose and [U-13C]glucose tracers // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2005. V. 288. No. 2. P. E206-E211.
17. Ogawa A., Murayama H., Hayamizu K., Kobayashi Y., Kuwahata M., Kido Y. A Simple evaluation method for the quality of dietary protein in rats using an indicator amino acid oxidation technique // J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2015. V. 61. No. 2. P. 123-130.
18. Phillips M., Herrera J., Krishnan S., Zain M., Greenberg J., Cataneo R.N. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1999. V. 729. No. 1-2. P. 75-88.
19. Quera R.P., Quigley E.M., Madrid A.M. Sobrecrecimiento bacteriano intestinal // Rev. Med. Chil. 2005. V. 133. P. 1361-1370.
20. Raj T., Kuriyan R., Kurpad A.V. Bicarbonate kinetics in Indian males // J. Biosci. 2006. V. 31. P. 273-280.
21. Uchida M., Endo N., Shimizu K. Simple and noninvasive breath test using <sup>13</sup>C-acetic acid to evaluate gastric emptying in conscious rats and its validation by metoclopramide // J. Pharmacol. Sci. 2005. V. 98. No. 4. P. 388-395.
22. Zolin P.P., Conway V.D. Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats // Bul. Exper. Biol. 1997. V. 124. No. 6. P. 1180-1182.

## References

1. Denisenko T.L., Perfilova K.M., Neumoina N.V., Shutova I.V., Neumoina M.V., Efimova E.I. Diagnostika SIBR u bol'nyh helikobakter-associrovannoj gastroduodenal'noj patologiej // Vestnik NNGU. 2012. № 2-3. S. 41-44.
2. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zahariya E.A., Zapadnyuk B.V. Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержание, ispol'zovanie v ehksperimente. - Kiev: Vishcha shkola. 1983. 383 s.
3. Zolin P.P., Lebedev V.M., Konvaj V.D. Matematicheskoe modelirovanie biokhimicheskikh processov s primeneniem regressionnogo analiza: monografiya. - Omsk: Izd-vo Omskogo gos. un-ta. 2009. 344 s.
4. Kopylov F.Yu., Syrkin A.L., Chomahidze P.Sh., Bykova A.A., Shaltaeva Yu.R., Belyakov V.V., Pershenkov V.S., Samotaev N.N., Golovin A.V., Vasil'ev V.K., Malkin E.K., Gromov E.A., Ivanov I.A., Lipatov D.Yu., Yakovlev D.Yu. Perspektivy diagnostiki razlichnyh zabolevanij po sostavu vydyhaemogo vozduha // Klinicheskaya medicina. 2013. № 10. S. 16-21.
5. Nemcov L.M. Sindrom izbytochnogo bakterial'nogo rosta: aktual'nye voprosy diagnostiki i menezhmenta // Vestnik VGMU. 2015. T.14. № 2. S. 5-15.
6. Sergienko V.I., Bondareva I.B. Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyah. - M.: GEHOTAR-Media. 2006. 304 s.
7. Stepanov E.V. Metody vysokochuvstvitel'nogo gazovogo analiza molekul-biomarkerov v issledovaniyah vydyhaemogo vozduha // Trudy IOFAN. 2005. T. 61. S. 5-47.
8. Shcherbak I.G. Biologicheskaya himiya. - SPb: Izd-vo SPbGMU. 2005. 480 s.
9. Cao W., Duan Y. Breath analysis: potential for clinical diagnosis and exposure assessment // Clin. Chem. 2006. V. 52. P. 800-811.
10. Eisenmann A., Amann A., Said M., Datta B., Ledochowski M. Implementation and

- interpretation of hydrogen breath tests // *J. Breath Res.* 2008. V. 2. No. 4. 046002 (9 pp) doi:10.1088/1752-7155/2/4/046002. Epub 2008 Jul 24. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1752-7155/2/4/046002/pdf>.
11. **Gahl M.J., Benevenga N.J., Crenshaw T.D.** Rates of lysine catabolism are inversely related to rates of protein synthesis when measured concurrently in adult female rats induced to grow at different rates // *J. Nutr.* 1998. V. 128. No. 9. P. 1503-1511.
  12. **Kivits G.A.A., Ganguli-Swartouw M.A.C.R., Christ E.J.** The composition of alkanes in exhaled air of rats as a result of lipid peroxidation *in vivo*. Effects of dietary fatty acids, vitamin E and selenium // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. V. 665. No. 3. P. 559-570.
  13. **Kneepkens C.M., Lepage G., Roy C.C.** The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation // *Free Radic. Biol. Med.* 1994. V. 17. No. 2. P. 127-160.
  14. **Ledochowski M.** Hydrogen breath tests. - Innsbruck: Verlag Ledochowski, 2008. 64 p.
  15. **Miekisch W., Schubert J.K., Noeldge-Schomburg G.F.** Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds // *Clin. Chim. Acta.* 2004. V. 347. P. 25-39.
  16. **Moseley L., Jentjens R.L.P.G., Waring R.H., Harris R.M., Harding L.K., Jeukendrup A.E.** Measurement of exogenous carbohydrate oxidation: a comparison of [U-14C]glucose and [U-13C]glucose tracers // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005. V. 288. No. 2. P. E206-E211.
  17. **Ogawa A., Murayama H., Hayamizu K., Kobayashi Y., Kuwahata M., Kido Y.** A Simple evaluation method for the quality of dietary protein in rats using an indicator amino acid oxidation technique // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2015. V. 61. No. 2. P. 123-130.
  18. **Phillips M., Herrera J., Krishnan S., Zain M., Greenberg J., Cataneo R.N.** Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999. V. 729. No. 1-2. P. 75-88.
  19. **Quera R.P., Quigley E.M., Madrid A.M.** Sobrecrecimiento bacteriano intestinal // *Rev. Med. Chil.* 2005. V. 133. P. 1361-1370.
  20. **Raj T., Kuriyan R., Kurpad A.V.** Bicarbonate kinetics in Indian males // *J. Biosci.* 2006. V. 31. P. 273-280.
  21. **Uchida M., Endo N., Shimizu K.** Simple and noninvasive breath test using <sup>13</sup>C-acetic acid to evaluate gastric emptying in conscious rats and its validation by metoclopramide // *J. Pharmacol. Sci.* 2005. V. 98. No. 4. P. 388-395.
  22. **Zolin P.P., Conway V.D.** Disturbances of hypoxanthine metabolism in the liver of resuscitated rats // *Bul. Exper. Biol.* 1997. V. 124. No. 6. P. 1180-1182.

## Measurement of the isotopic label incorporation in the breath CO<sub>2</sub>

P.P. Zolin, V.D. Conway

This study reports a simple <sup>14</sup>C-breath test in rats. The expired carbon dioxide in the chamber was collected in a breath-sampling system using a pump after intravenous injection of <sup>14</sup>C-glucose. The level of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in the expired air was measured at 10-min intervals for 30 min. The received data confirm that this method is suitable for medical and biological investigations using labeled compounds.

**Key words:** breath tests, isotopic label, carbon dioxide, glucose.