

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Кубанский государственный университет»

На правах рукописи



**ГАШИМОВА ЭЛИНА МАНСУРОВНА**

**ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА ЛЕГКИХ  
ПО ВЫДЫХАЕМОМУ ВОЗДУХУ**

**1.4.2 – Аналитическая химия (химические науки)**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук,  
доцент Темердашев А.З.

Краснодар

2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 Аналитический обзор.....	10
1.1 Современные методы диагностики онкологических заболеваний.....	10
1.2 Анализ выдыхаемого воздуха.....	15
1.2.1 Отбор проб выдыхаемого воздуха.....	16
1.2.2 Концентрирование летучих органических соединений пробы.....	19
1.2.3 Детектирование летучих органических соединений.....	21
1.2.3.1 Газовая хроматография.....	21
1.2.3.2 Методы масс-спектрометрии при определении ЛОС.....	22
1.2.3.3 Сенсорные системы анализа типа «электронный нос».....	23
1.3 Результаты исследований различными методами по идентификации биомаркеров рака легких.....	27
1.3.1 Газовая хроматомасс-спектрометрия.....	27
1.3.2 Масс-спектрометрия.....	39
1.3.3 Сенсорные системы.....	40
1.4 Возможные причины неоднозначности результатов, полученных различными исследовательскими группами.....	47
1.4.1 Дифференцирование гистологического типа и стадии заболевания по составу выдыхаемого воздуха.....	47
1.4.2 Биомаркеры рака легких в тканях и клеточных линиях.....	49
1.4.3 Биомаркеры оценки эффективности лечения рака легких.....	51
1.4.4 Селективность биомаркеров рака легких к другим заболеваниям.....	52
1.4.5 Другие факторы, влияющие на профиль летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе.....	56
1.5 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования.....	60
2 Экспериментальная часть.....	62
2.1 Материалы, реактивы и использованное оборудование.....	62

2.2 Участники исследования .....	64
2.3 Оптимизация условий газохроматографического определения ЛОС в выдыхаемом воздухе.....	68
2.3.1 Выбор оптимальной газохроматографической колонки для разделения ЛОС из выдыхаемого воздуха .....	69
2.3.2 Исследование эффективности различных типов сорбентов для концентрирования ЛОС из выдыхаемого воздуха .....	72
2.3.3 Оптимизация условий концентрирования ЛОС .....	74
2.3.4 Изучение влияния условий хранения на дискриминацию пробы .....	74
2.4 Возможности использования «электронного носа» с пьезосенсорами для.. анализа выдыхаемого воздуха .....	77
2.4.1 Аналитические характеристики определения компонентов выдыхаемого воздуха с использованием «электронного носа» на основе пьезосенсоров .....	77
2.4.2 Оптимизация условий анализа выдыхаемого воздуха с помощью «электронного носа».....	87
2.5 ГХ-МС и ГХ-ПИД анализ образцов выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и здоровых людей.....	88
2.5.3 Анализ образцов выдыхаемого воздуха с применением «электронного носа» и ГХ-МС .....	98
2.5.3.1 Анализ образцов выдыхаемого воздуха с применением «электронного носа» .....	98
2.5.3.2 Анализ выдыхаемого воздуха методом ГХ-МС .....	100
2.6 Влияние различных факторов на состав ЛОС в выдыхаемом воздухе .....	107
2.7 Вариативность профилей ЛОС пациентов с раком легких в зависимости от различных факторов.....	110
2.7.1 Вариативность профилей ЛОС выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких в зависимости от гистологического типа и локализации опухоли .....	110
2.7.2 Сравнительная характеристика до и послеоперационных профилей ЛОС из выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и пациентов с доброкачественными опухолями .....	113

2.7.3 Идентификация потенциальных биомаркеров рака легких в опухолевых тканях .....	118
2.8 Расширение выборки для диагностики и статистическое моделирование .	125
2.8.1 ГХ-МС анализ проб выдыхаемого воздуха расширенной выборки добровольцев.....	125
2.8.2 Статистический анализ данных и моделирование .....	126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	132
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	134

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВП-МС – времяпролетный масс спектрометр

ГХ-МС – газовая хроматомасс-спектрометрия

ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием

ДА – дискриминантный анализ

ИНС – искусственные нейронные сети

КТ – компьютерная томография

ЛОС – летучие органические соединения

МГК – метод главных компонент

МКК – мультикапиллярная колонка

МРЛ – мелкоклеточный рак легких

МС ВИП – масс-спектрометрии выбранных ионов в потоке

МС-ИЦР ПФ – масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье

НМРЛ – немелкоклеточный рак легких

ПРЛ – плоскоклеточный рак легких

РЛ – рак легких

РПП – реакция переноса протона

СИП – спектрометрия ионной подвижности

ТД – термическая десорбция

ТФМЭ – твердофазная микроэкстракция

ФИАД – фотоионизация при атмосферном давлении

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

САР – карбоксен

DVB – дивинилбензол

PDMS – полидиметилсилоксан

PLOT – открытые капиллярные колонки с пористым слоем

TNM – первичная опухоль, регионарные лимфатические узлы, отдалённые метастазы

## ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются, помимо сердечно-сосудистых, одними из наиболее распространенных причин смерти. Большое разнообразие форм и проявлений не всегда удается диагностировать на ранних и сложно лечить на запущенных стадиях и приводят к тяжелому протеканию болезни, повышению вероятности летального исхода. Рак легких – наиболее агрессивный вид онкологии с рекордным количеством летальных исходов. Симптомы данного заболевания зачастую неспецифичны, и могут быть ошибочно отнесены к признакам старения или курения, а для установления диагноза в большинстве случаев необходима биопсия, инвазивная и длительная, сопряженная со стрессом процедура, а в некоторых случаях с необходимостью госпитализации пациента.

В последние годы во всем мире активно проводятся исследования, направленные на разработку альтернативных способов диагностики рака легких по специфичным биомаркерам в биологических матрицах. Особенно интересными представляются подходы, предполагающие неинвазивный отбор проб, такие, как выдыхаемый воздух, конденсат выдыхаемого воздуха, слюна, моча и другие, из которых наиболее простым и непосредственно связанным с работой легких является выдыхаемый воздух. В связи с этим, разработка методов диагностики и анализа, позволяющих выявить рак легких на ранних стадиях, представляется актуальной проблемой. Выявление по наличию / отсутствию или изменению содержания биомаркеров позволит диагностировать рак легких на ранних стадиях, более эффективно определить характер заболевания и повысить эффективность назначаемой терапии.

Многие научные центры в мире работают в данном направлении, но диагностика рака легких по данным анализа выдыхаемого воздуха по-прежнему находится на исследовательском уровне и практически не используется в клинической практике. На сегодняшний день не установлен достоверный перечень биомаркеров, характерный для данного заболевания. Среди применяемых для диагностики этого заболевания аналитических методов наиболее информативным

является метод газовой хроматомасс-спектрометрии, позволяющий выявлять потенциальные для рака легких биомаркеры, проводить качественный и количественный анализ выдыхаемого воздуха. Возможности этого метода позволяют рассматривать его как наиболее обоснованный и оптимальный способ изучения профиля летучих органических соединений (ЛОС) из выдыхаемого воздуха и идентификации потенциальных биомаркеров.

**Цель диссертационного исследования** – создание неинвазивного способа диагностики рака легких по компонентному составу выдыхаемого человеком воздуха методами хроматомасс-спектрометрии на основе выявленного перечня наиболее информативных для заболевания биомаркеров.

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

- оптимизация условий отбора проб выдыхаемого воздуха, концентрирования и детектирования аналитов (ЛОС) аналитическими методами;
- изучение аналитических характеристик «электронного носа» на основе пьезосенсоров, хроматографического разделения и детектирования по отношению к компонентам выдыхаемого воздуха;
- выявление потенциальных биомаркеров рака легких по результатам анализа выдыхаемого воздуха различными аналитическими методами;
- влияние статуса курения, гендерной принадлежности, гистологического типа, локализации и резекции опухоли на состав выдыхаемого воздуха;
- оптимизация условий концентрирования выделяемых опухолевой тканью ЛОС, сопоставление различных профилей, характерных для выдыхаемого воздуха;
- построение диагностических моделей различными методами машинного обучения.

**Научная новизна** диссертационного исследования.

1. Разработан способ диагностики рака легких, включающий ГХ-МС анализ выдыхаемого воздуха и выявление потенциальных биомаркеров заболевания.

2. Получены данные по влиянию статуса курения, гендерной принадлежности, гистологического типа, локализации и резекции опухоли на профиль ЛОС выдыхаемого воздуха.

3. Установлены профили выдыхаемого воздуха и выделяемых опухолевыми тканями летучих органических соединений, по соотношениям их содержаний построены диагностические модели различными методами машинного обучения.

**Практическая значимость.**

Разработаны методика анализа выдыхаемого воздуха при диагностике рака легких и программное приложение, позволяющие диагностировать рак легких с высокой вероятностью по профилю ЛОС выдыхаемого воздуха (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021662555 «Прогнозирование рака легких методом нейронных сетей»).

**Положения, выносимые на защиту:**

- методика газохроматографического анализа выдыхаемого человеком воздуха;
- дифференциация проб выдыхаемого воздуха различных групп больных раком легких и здоровых людей;
- хемометрическая оценка влияния статуса курения и гендерной принадлежности на компонентный состав выдыхаемого воздуха;
- оценка вариативности компонентного состава выдыхаемого воздуха в зависимости от гистологического типа и локализации опухоли, изменчивости профиля ЛОС после удаления опухоли;
- результаты исследований по изучению профиля выделяемых опухолевой тканью ЛОС;
- программа для ЭВМ для диагностики рака легких по результатам анализа выдыхаемого воздуха.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность полученных результатов обусловлена значительным объемом экспериментальных данных, репрезентативностью выборки анализируемого материала, применением методов машинного обучения и хемометрической оценки данных, использованием современных методов анализа и научного оборудования для хроматографических и масс-спектрометрических исследований.

**Апробация работы.** Результаты работы обсуждены на V Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2018 г.), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019 г.), 25th International Symposium on Separation Sciences (Лодзь, 2019 г.), III Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (Краснодар, 2019 г.), IV Всероссийской конференции по аналитической хроматографии и капиллярному электрофорезу (Краснодар, 2020 г.), MENDELEEV 2021 The XII International Conference On Chemistry For Young Scientists (Санкт-Петербург, 2021 г.), VI Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Краснодар, 2021 г.).

Диссертационное исследование выполнялось в рамках проекта Госзадания Минобрнауки РФ № FZEN-2020-0022, гранта РФФИ (№ 20-33-90033) и гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-13-20018 с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» ФГБОУ ВО «КубГУ».

## 1 Аналитический обзор

### 1.1 Современные методы диагностики онкологических заболеваний

Среди приоритетных направлений развития современной медицины разработка эффективных, экспрессных и неинвазивных способов диагностики социально-значимых заболеваний является актуальной проблемой. Одним из наиболее труднодиагностируемых, быстро и бессимптомно развивающихся агрессивных заболеваний с наибольшим количеством летальных исходов является рак легких [1–4]. Эффективность диагностики рака легких остается низкой, так как симптомы данного заболевания зачастую трудно опознать и легко спутать с признаками старения или курения. В современной клинической практике основными способами диагностики рака легких являются компьютерная томография (КТ) [5, 6] и биопсия [7, 8]. При исследовании КТ возможно обнаружить образование в легких, однако для определения характера образования и, в случае обнаружении злокачественного образования, надежной диагностики гистологического типа опухоли, необходима биопсия - инвазивная и длительная процедура, сопряженная со стрессом и, в некоторых случаях, с необходимостью госпитализации пациента. В связи с этим альтернативные способы диагностики рака легких по специфическим биомаркерам в различных биологических объектах изучаются и активно развиваются в последние годы. Особенно интересным представляются подходы, предполагающие неинвазивный отбор проб, такие, как выдыхаемый воздух [9–11], конденсат выдыхаемого воздуха [11–17], моча [18–24], слюна [25–29]. В первую очередь, это обусловлено простотой процедуры отбора проб, не сопряженной с дискомфортом для пациента, что впоследствии позволит существенно повысить диагностический охват процедуры при успешном прохождении этапа исследовательских работ. Выдыхаемый воздух является одним из наиболее распространенных объектов исследования для идентификации биомаркеров рака легких [30–36]. Профиль летучих органических соединений (ЛОС), содержащихся в выдыхаемом воздухе здорового человека, содержит более

1000 компонентов эндогенного и экзогенного происхождения [37–39]. Биохимические процессы, продуктом которых являются ЛОС, выделяющиеся через дыхательные пути, известны лишь для некоторых обнаруживаемых в выдыхаемом воздухе компонентов. Например, ацетон образуется при декарбоксилировании фермента ацетил-КоА, а изопрен является одним из побочных продуктов при синтезе холестерина в цитозольной фракции. Присутствие предельных углеводов в выдыхаемом воздухе обусловлено пероксидным окислением полиненасыщенных жирных кислот в результате воздействия свободных радикалов, которые в дальнейшем могут окисляться до спиртов, альдегидов и кетонов [40, 41].

Нарушения пролиферации и апоптоза клеток при злокачественных образованиях легких могут существенно исказить профиль ЛОС, содержащихся в выдыхаемом воздухе [42]. Обнаружение изменений в количественном и качественном составе выдыхаемого воздуха, характерных для рака легких, является основой создания неинвазивного, экспрессного и простого способа диагностики, который позволит проводить массовые обследования в комфортном для пациентов режиме.

Исследования по выявлению специфичных для рака легких биомаркеров в выдыхаемом воздухе начали проводить еще в конце прошлого столетия [43–46]. Интерес научного сообщества к данному направлению исследований обусловлен активным развитием как приборостроения, так и совершенствованием способов подготовки и концентрирования проб, а также разработкой новых сорбционных материалов.

Несмотря на то, что целый ряд научных групп достаточно активно работает в данном направлении, диагностика рака легких по выдыхаемому воздуху по-прежнему находится на исследовательском уровне и практически не используется в клинической практике. На сегодняшний день еще не установлен достоверный перечень биомаркеров, по которым можно было бы судить о статусе заболевания. Исходя из анализа литературы, рассматриваемой в рамках тематики данного диссертационного исследования, можно выделить ряд ЛОС, которые относят к

биомаркерам рака легких наиболее часто (в трех и более исследованиях). К ним относятся производные бензола, спирты, альдегиды, кетоны и некоторые другие (рисунок 1).

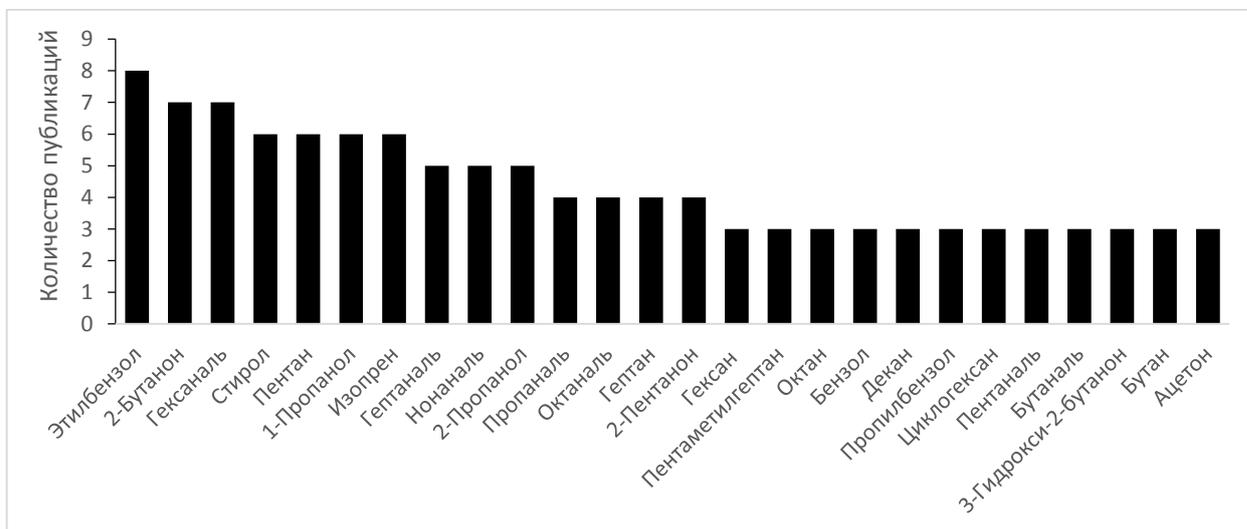


Рисунок 1 – Летучие органические соединения, наиболее часто отмечаемые исследователями как потенциальные биомаркеры

В посвященных анализу выдыхаемого воздуха для диагностики рака легких публикациях далеко не во всех отображена информация о содержании предполагаемых биомаркеров в выдыхаемом воздухе. В таблице 1 представлены концентрации некоторых предполагаемых биомаркеров в пробах пациентов с раком легких и здоровых людей. Концентрации компонентов весьма низкие, что требует применения аналитических методов, способных одновременно определять широкий круг ЛОС в данных диапазонах концентраций.

Таблица 1 – Содержание некоторых потенциальных биомаркеров в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых людей

Биомаркер	Диапазон концентраций, медиана, ppb (если не указано иное)		Ссылка
	Здоровые добровольцы	Пациенты с раком легких	
Этилбензол	3–16, 3, -	3–9, 4, -	[47]
	8.6–14.0, 10.4	4.6–89.3, 19.6	[48]

## Продолжение таблицы 1

Биомаркер	Диапазон концентраций, медиана, ppb (если не указано иное)		Ссылка
	Здоровые добровольцы	Пациенты с раком легких	
	10.8–15.1, 13.6 пМ	13.6–32.6, 24.0 пМ	[49]
	1.45–3.16, -	2.22–18.38, -	[50]
2-Бутанон	5–50, 7	7–14, 9	[47]
	1.35–3.18, -	1.35–2.86, -	[50]
	3.8–8.8, 5.1	3.8–38.8, 8.8	[48]
Гексаналь	2–8, 3	2–14, 4	[47]
	0	3.8–5.3, 4.5	[48]
	0 нмоль/л	0.010 нмоль/л	[51]
	7.0–13.8, 10.3 пМ	26.6–57.7, 38.1 пМ	[52]
Стирол	5.3–21.8, 12.3 пМ	8.5–37.2, 17.9 пМ	[49]
Пентан	3–664, 111	3–223, 11	[47]
	6.8–14.3, -	0.7–17.5, -	[53]
	7.0–412.4, 104.8	3.7–116.7, 39.8	[48]
	107.7–462.7, 268.0 пМ	361.3–1112.5, 647.5 пМ	[49]
	6.84–94.36, -	0.73–17.50, -	[50]
1-Пропанол	29–116, 61	29–424, 99	[47]
	0	4.37–13.15, -	[53]
	6.6, 6.6	5.4–473.3, 54.8	[48]
	0	4.37–93.15, -	[50]
Изопрен	27–812, 190	66–870, 280	[47]
	19.5–200.5, 70.8	19.2–295.5, 100.3	[48]
	1399–6589, 3789 пМ	3130–8863, 6041 пМ	[49]
	1.30–498.01, -		[54]
	37–234, -		[55]
Гептаналь	-, 0.003 нмоль/л	-, 0.011 нмоль/л	[51]
	3.8–10.1, 6.9 пМ	9.3–21.3, 16.1 пМ	[52]
Нонаналь	-, 0.033 нмоль/л	-, 0.239 нмоль/л	[51]
	7.2–22.7, 13.3 пМ	31.6–62.5, 48.2 пМ	[52]
2-Пропанол	19–725, 169	20–1007, 498	[47]
	3.21–4.17, -	3.32–7.19, -	[53]
	13.3, 13.3	8.7–989.2, 149.5	[48]
	3.21–14.17, -	3.32–19.19, -	[50]

## Продолжение таблицы 1

Биомаркер	Диапазон концентраций, медиана, ppb (если не указано иное)		Ссылка
	Здоровые добровольцы	Пациенты с раком легких	
Пропаналь	1–12, 5	1–82, 19	[47]
	1.56–3.44, -	1.56–3.74, -	[53]
	5.6–9, 6.9	5.5–33.8 7.8	[48]
	0.000 нмоль/л	-, 0.009 нмоль/л	[51]
	42.4–72.6, 52.4 пМ	17.1–46.9, 24.4 пМ	[52]
	0.56–3.44, -	0.66–3.74, -	[50]
Октаналь	0.011 нмоль/л	0.052 нмоль/л	[51]
	7.2–16.2, 11.6 пМ	17.7–33.2, 23.6 пМ	[52]
Гептан	3–9, 5	2–4, 3	[47]
	3.6–13.5, 5.2	3.1–4.3, 3.4	[48]
	5.0 – 15.3, 8.4	1.5 – 34.0, 13.5	[49]
2-Пентанон	5–10, 6	5–39, 9	[47]
	1.80–4.11	3.25–8.77	[53]
	4.6–5.1, 4.8	4.4–53.2, 7.5	[48]
Гексан	3–145, 18	3–16, 10	[47]
	1.75–6.31, -	1.44–1.88, -	[53]
	4.8–46.3, 20.3	2.5–76.1, 33.6	[48]
	1.75–6.31, -	0.82–1.88, -	[50]
Октан	4.0–50.8, 20.2 пМ	22.4–112.9, 61.0 пМ	[49]
Бензол	3–23, 7	3–10, 5	[47]
	1.38–14.97, -	1.29–3.82, -	[53]
	4.3–12.2, 6.3	4.3–10.5, 5.4	[48]
	27.7–68.6, 44.7 пМ	62.2–132.2, 94.5 пМ	[49]
	1.15–14.97, -	0.88–3.82, -	[50]
Декан	4–72, 11	3–35, 9	[47]
	14.3–405.5, 208.7 пМ	277.9–1321.6, 568.0 пМ	[49]
Циклогексан	1–96, 20	3,1, 3,1	[47]
Пентаналь	5–11, 7	4–7, 5	[47]
	0	4.8–7.2, 5.9	[48]
	4.4–14.7, 8.2 пМ	12.7–42.6, 17.7 пМ	[52]
	0.002 нмоль/л	0.019 нмоль/л	[51]
Бутаналь	1.35–1.87, -	1.32–2.55, -	[53]

## Продолжение таблицы 1

Биомаркер	Диапазон концентраций, медиана, ppb (если не указано иное)		Ссылка
	Здоровые добровольцы	Пациенты с раком легких	
	6.9–18.6, 10.8 пМ	18.7–41.0, 26.2 пМ	[52]
	0.52–1.87, -	0.78–2.55, -	[50]
3-Гидрокси-2-бутанон	Менее 6.21 нг/л, 1.29 нг/л	1.95–50.30 нг/л, 8.28 нг/л	[56]
Бутан	5.2–165.7, 56.2	6.1–421.3, 90.3	[47]
	0.46–16.63, -	0.58–2.71, -	[50]
Ацетон	135–3167, 580	83–7769, 1000	[47]
	41.6–753.4, 225.7	112.3–2653.7, 358.6	[48]
	44.20–531.45, -	34.57–390.60, -	[53]
	14.44–531.45, -	34.57–390.60, -	[50]
	48.20–1159.13, -		[54]
	60–689.4, -		[55]

Примечание. «-» – информация не указана

Перечень предполагаемых биомаркеров весьма широк, а диапазоны концентраций определяемых в выдыхаемом воздухе ЛОС значительно разнятся у различных авторов, что можно объяснить отсутствием единого подхода к методическому обеспечению способа ранней диагностики онкологических заболеваний по выдыхаемому воздуху.

## 1.2 Анализ выдыхаемого воздуха

На сегодняшний день не установлен единый способ анализа проб выдыхаемого воздуха для целей диагностики рака легких. Профиль ЛОС образца можно анализировать различными аналитическими методами, некоторые из них предполагают стадии отбора проб и концентрирования аналитов пробы, которые также можно проводить по-разному. Каждый из вариантов процедуры проведения той или иной стадии анализа имеет свои особенности, достоинства и недостатки.

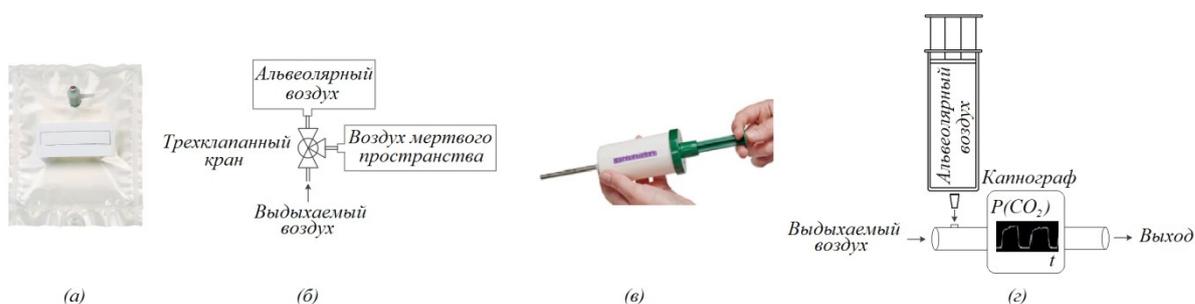
### 1.2.1 Отбор проб выдыхаемого воздуха

Схемы отбора проб выдыхаемого воздуха можно условно разделить на две группы, отличные по количественному и качественному составу: воздух мертвого пространства и альвеолярный воздух. Альвеолярный воздух содержит преимущественно эндогенные компоненты, попадающие в легочные альвеолы в результате газообмена с кровью [57–59], а воздух мертвого пространства – это воздух, заполняющий дыхательные пути и не участвующий в газообмене с кровью, вследствие чего в его состав входит много экзогенных компонентов. На сегодняшний день единый подход к отбору проб выдыхаемого воздуха отсутствует, поэтому можно наблюдать значительную вариативность способов отбора проб в различных исследованиях, что может отражаться и на результатах.

Отобранная проба может содержать компоненты, отобранные за один или несколько выдохов. Зачастую при отборе проб за один выдох участнику исследования необходимо сделать маневр форсированной жизненной емкости легких (глубокий вдох и выдох), что обеспечивает получение наиболее информативных результатов [60], однако выполнение маневра при патологии может вызвать затруднения вплоть до болевых ощущений и невозможности полноценно осуществить процедуру. Это обстоятельство может вносить существенную погрешность на результаты исследований. Более надежные и воспроизводимые результаты получаются при отборе усредненной пробы, полученной за несколько выдохов [61]. Также на состав выдыхаемого воздуха могут влиять скорость выдоха и задержка дыхания [62, 63].

Использование химически инертных пакетов из таких материалов, как тедлар или майлар, для отбора проб – наиболее простой и распространенный способ отбора проб выдыхаемого воздуха (рисунок 2, а), однако применение пакетов для отбора проб имеет ряд недостатков. Отобранные в пробоотборные пакеты образцы хранятся преимущественно не дольше 6–8 ч. С другой стороны, в работе [64] отмечено, что потери пробы при хранении в пакете тедлар в течение 52 часов составляют не более 10%. Немаловажным фактором, который необходимо

учитывать при хранении пробы в пакете тедлар, является низкая устойчивость мембраны к твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) по отношению к внешним загрязнителям. В этом случае возможна контаминация пробы компонентами окружающего воздуха при длительном хранении [65]. Источниками загрязнения пробы фенолом и N,N-диметилацетамидом при хранении являются и сами пробоотборные пакеты [64]. Стоит отметить, что степень контаминации тедларовых пакетов варьируется в зависимости от производителя [66]. Данные факторы необходимо принимать во внимание для исключения ложной интерпретации результатов. Следует учитывать, что при отборе выдыхаемого воздуха в пробоотборный пакет в пробу попадает воздух мертвого пространства, что сопряжено с наличием в образце экзогенных компонентов, которые могут быть ошибочно интерпретированы как биомаркеры.



а – пробоотборный пакет, б – система из двух пакетов, соединенных трехклапанным краном, в – пробоотборник BioVOC, г – система из пластиковой трубки и шприца, подсоединённой к капнографу

Рисунок 2 – Варианты отбора проб

Для получения более информативной картины относительно эндогенных компонентов, входящих в состав выдыхаемого воздуха, применяют пробоотборники, позволяющие снижать долю воздуха мертвого пространства в пробе путем отброса фиксированного количества образца в начале выдоха. Отброс неинформативной части пробы может осуществляться использованием системы из двух пакетов, соединенных трехклапанным краном (рисунок 2, б) [67, 68], либо путем применения расходомера с клапаном, который открывается после пропускания фиксированного количества пробы [69]. Подобный принцип работы

положен в основу коммерчески доступного и широко используемого пробоотборника BioVOC (рисунок 2, в) [49, 52, 70–72], позволяющего отбросить всю пробу, кроме последних 150 мл. Применение подобных устройств для отбора проб позволяет снизить количество экзогенных компонентов в образце, однако доля альвеолярного воздуха в пробе может быть различной у разных людей в зависимости от объема легких, что может вносить дополнительную погрешность в результаты.

Наиболее надежным способом получения пробы альвеолярного воздуха является использование пробоотборников, в которых разделение выдыхаемого и альвеолярного воздуха основано на отличии концентрации углекислого газа в альвеолярном и выдыхаемом воздухе, которую определяют с помощью капнографа. Существуют различные виды подобных пробоотборников – от самых простых, собранных вручную (рисунок 2, г), состоящих из подсоединённой к капнографу пластиковой трубки [51, 58], до коммерчески реализуемых приборов – более усовершенствованных, позволяющих в автоматическом режиме направлять поток альвеолярного воздуха в пробоотборный пакет [48, 51, 73, 74] либо в сорбционную трубку [75]. Концентрации эндогенных соединений в пробах альвеолярного воздуха значительно выше, поэтому данный подход является наиболее предпочтительным для применения в клинических исследованиях, однако необходимость использования дополнительного оборудования может ограничить мобильность отбора проб и отразиться на пропускной способности при проведении массовых обследований.

Стоит отметить, что при хранении пробы при комнатной температуре возможна конденсация водяного пара в пакете для отбора проб и во всех соединяющих линиях пробоотборников, что влечет за собой частичную адсорбцию полярных компонентов пробы и возможные искажения результатов анализа. Для предотвращения конденсации водяного пара в некоторых пробоотборниках предусмотрен нагрев соединяющих линий и пакетов до 37–40 °C [76, 77], однако в работе [56] отмечается, что при температуре более 30 °C ацетон, в некоторых публикациях отмеченный как биомаркер рака легких, окисляется до диацетила. В

связи с этим при использовании проботборников, предусматривающих нагрев пробы, отнесение данных компонентов к биомаркерам может привести к ошибочным выводам.

### 1.2.2 Концентрирование летучих органических соединений пробы

Поскольку концентрации многих ЛОС в выдыхаемом воздухе малы, применение ряда аналитических методов требует стадии предварительного концентрирования, которое, как правило, осуществляется с использованием сорбционных трубок [78, 79] или волокон для ТФМЭ [80, 81]. Основные характеристики данных способов концентрирования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Аналитические характеристики способов концентрирования в сорбционных трубках и на волокне для твердофазной микроэкстракции

Сорбционные трубки			ТФМЭ		
Сорбент; T <sub>max</sub> , °C	Удерживаемые ЛОС	Ссылка	НЖФ*; T <sub>max</sub> , °C	Удерживаемые ЛОС	Ссылка
Тенакс ТА 60/80 меш (поли(2,6-дифенил-р-фениленоксид); 350	Ароматические неполярные ЛОС (t кипения более 100°C) и менее летучие полярные ЛОС (t кипения более 150°C)	[45, 70, 76, 82]	PDMS; 300	Низкомолекулярные неполярные ЛОС	[76, 83]
Карбопак В 60/80 меш (графитированный уголь); 400	Алкилбензолы и алифатические ЛОС (C8–C16)	[84, 85, 86]	CAR/PDMS; 320	Следовые количества ЛОС	[50, 53, 56, 87]
Карботрап 20/40 меш (графитированный уголь); 400	Кетоны, спирты, альдегиды, все неполярные соединения (t кипения более 75°C), перфторуглеродные газы	[46, 77]	CAR/PDMS/DVB; 270	Следовые количества ЛОС (C3–C20)	[70, 88, 89]

## Продолжение таблицы 2

Сорбционные трубки			ТФМЭ		
Сорбент; T <sub>max</sub> , °C	Удерживаемые ЛОС	Ссылка	НЖФ*; T <sub>max</sub> , °C	Удерживаемые ЛОС	Ссылка
Карбосив SIII 60/80 меш (углеродное молекулярное сито); 400	Сверхлетучие соединения (углеводороды C3, C4, летучие галогенсодержащие соединения и фреоны)	[46, 83]	DVB/PDMS; 270	Полярные соединения, летучие органические амины и нитроароматические соединения, спирты	[90]

Примечание. PDMS – полидиметилсилоксан; CAR – карбоксен; DVB – дивинилбензол

Выдыхаемый воздух содержит широкий спектр ЛОС разных классов, что обуславливает применение комбинированных сорбционных материалов. В случае применения сорбционных трубок довольно часто используют сочетание тенакса и углеродных молекулярных сит [83, 91], сорбентов на основе графитированного углерода [65, 72, 77], а также полимерный сорбент тенакс [70, 76, 82]. При концентрировании с применением ТФМЭ в основном применяют биполярную фазу карбоксен / полидиметилсилоксан [47, 55, 56, 87], позволяющую концентрировать широкий спектр ЛОС в следовых количествах, также нередко используют полидиметилсилоксан [76, 83].

Метод концентрирования ЛОС из выдыхаемого воздуха в сорбционных трубках позволяет извлекать все ЛОС из пробы и является относительно простым в реализации, однако к недостаткам можно отнести необходимость применения дополнительного оборудования. Преимуществами ТФМЭ являются простота и отсутствие необходимости применения дополнительного оборудования, однако, при длительном экспонировании волокна в пробе его емкости может оказаться недостаточно, вследствие чего может возникнуть значительная дискриминация пробы. Другим недостатком является сложность практического применения, обусловленная хрупкостью волокна.

При концентрировании некоторых компонентов выдыхаемого воздуха, таких, как альдегиды и кетоны, содержание которых в выдыхаемом воздухе может быть ниже пределов обнаружения, целесообразно применять дериватизацию [92]. Один из способов – дериватизация альдегидов на волокне для ТФМЭ с пентафторбензолгидроксиламин гидрохлоридом в качестве дериватирующего агента [93], который неоднократно применяли для определения альдегидов в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых людей [51, 52].

Описан [94] другой способ дериватизации альдегидов и кетонов в выдыхаемом воздухе с применением микрореактора, представляющего собой кремниевую пластинку, покрытую слоем аминоокси-функционализированной соли четвертичного аммония, которая селективно взаимодействует с альдегидами и кетонами с образованием оксимового эфира, впоследствии определяемого на масс-спектрометре с преобразованием Фурье. Этот способ был применен для идентификации биомаркеров рака легких в выдыхаемом воздухе [95, 96].

Разрабатываются альтернативные сорбционные материалы для концентрирования ЛОС из выдыхаемого воздуха [97], а также применяются нетрадиционные способы, например, концентрирование компонентов пробы из выдыхаемого воздуха в ацетон [84].

### 1.2.3 Детектирование летучих органических соединений

#### 1.2.3.1 Газовая хроматография

Методы газовой хроматографии широко применяют для исследования профиля ЛОС в выдыхаемом воздухе, так как они позволяют определять большое количество соединений в достаточно низком концентрационном диапазоне (от ppb до ppt) [98–100]. Ввиду вариативности состава проб в широких пределах концентраций разделить все ЛОС, используя одну газохроматографическую колонку практически невозможно. Для решения данной задачи применяют различные типы газохроматографических колонок: диметилполисилоксан [49, 69,

72], фенил-диметилполисилоксан [70, 82, 88, 90, 101] цианопропилфенил-метилполисилоксан [87, 102], полиэтиленгликоль [45], открытые капиллярные колонки с пористым слоем (PLOT) [48, 53, 55, 103] либо для разделения более широкого круга ЛОС используют системы из двух последовательно соединенных колонок [65]. Наиболее распространенным методом анализа выдыхаемого воздуха является газовая хроматомасс-спектрометрия (ГХ-МС), поскольку данный метод позволяет одновременного идентифицировать большое число соединений и получать наиболее полную информацию о качественном и количественном составе пробы с достаточно высокой чувствительностью. Однако, метод ГХ-МС не лишен недостатков, существенно осложняющих внедрение методик анализа в клиническую практику. Чувствительности данного метода недостаточно для прямого анализа образцов, требуется предварительное многократное концентрирование аналитов. Метод ГХ-МС не позволяет анализировать пробы в режиме онлайн; процедура анализа, включающая отбор проб, концентрирование и детектирование, зачастую весьма длительна, а сложность как самого оборудования, так и интерпретации результатов требует высокой квалификации персонала. Тем не менее, учитывая возможность автоматизации ГХ-МС-анализа и возможности хранения проб в отобранном или концентрированном виде, данный подход вполне пригоден для массовых обследований. Для проведения рутинных работ возможно использование более простого в эксплуатации и при интерпретации результатов пламенно-ионизационного детектора [84], однако данный подход применим только при известном перечне необходимых биомаркеров, для определения которых чувствительность данного прибора будет достаточной.

### 1.2.3.2 Методы масс-спектрометрии при определении ЛОС

В методе спектрометрии ионной подвижности (СИП) молекулы образца сначала ионизируются, затем их разделение осуществляется за счет различной подвижности в потоке нейтрального газа, которая зависит от состава дрейфующего газа и электрического поля. С использованием метода СИП можно определять ЛОС

в концентрационном диапазоне от ppbv до pptv, вследствие чего анализ выдыхаемого воздуха данным методом не требует предварительного концентрирования. При анализе выдыхаемого воздуха зачастую применяют сочетание метода СИП с мультикапиллярной колонкой (МКК) для получения более информативных результатов [104]. Несмотря на отсутствие необходимости концентрирования и достаточно небольшое время анализа, которое зачастую составляет менее 8 мин, метод СИП не относится к методам онлайн анализа. К недостаткам относится низкая селективность, не позволяющая идентифицировать ЛОС [105].

Метод масс-спектрометрии с реакцией переноса протона (РПП) основан на протонировании аналита ионами  $\text{H}_3\text{O}^+$ , предварительно сформированными в парах воды в разряде низкого давления с применением полого катода [106]. Метод масс-спектрометрии выбранных ионов в потоке (МС ВИП) основан на химической ионизации аналитов ионами-реактантами  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{O}_2^+$ , или  $\text{NO}^+$ , предварительно выделенными из смеси компонентов, возбуждаемых в радиочастотном разряде с применением квадрупольного масс-фильтра [107]. Принципы работы РПП и МС ВИП схожи и отличаются только предварительным выделением ионов-реактантов. К достоинствам методов можно отнести высокую чувствительность и специфичность, а также высокую производительность за счет проведения анализа в онлайн режиме без стадии предварительного концентрирования. Однако данные методы пригодны для анализа ограниченного круга соединений, для которых сродство к протону больше, чем в молекуле иона-реактанта. К недостаткам также относится невозможность различить летучие вещества с одинаковым отношением массы к заряду, что сказывается на качестве идентификации. Кроме того, влажность образца существенно влияет на чувствительность анализа.

### 1.2.3.3 Сенсорные системы анализа типа «электронный нос»

В последние годы интенсивно развивается альтернативный подход к решению задачи диагностики онкологии легких по выдыхаемому воздуху,

основанный на применении сенсорных систем типа «электронный нос» [108–112]. Чувствительные элементы матриц химических сенсоров адсорбируют ЛОС или связываются с ними, что приводит к изменению свойств чувствительных элементов, которое можно измерить. Контролируемые параметры зависят от типа используемого датчика; это может быть, например, изменение проводимости, массы, вибрации или цвета чувствительного элемента. Датчики, как правило, перекрестно реагируют на множество ЛОС одновременно, в результате чего можно получить некий общий отклик на профиль ЛОС в выдыхаемом воздухе. Чувствительность сенсорных систем изменяется в зависимости от применяемых сенсорных технологий: некоторые датчики способны анализировать выдыхаемый воздух без предварительного концентрирования.

Анализ выдыхаемого воздуха для диагностики рака легких проводят с применением различных типов химических сенсоров. Широкое распространение имеют полупроводниковые сенсоры на основе оксидов металлов. Принцип действия таких сенсоров основан на реакции ЛОС с адсорбированным поверхностным кислородом, в результате чего изменяется преобразовательная способность полупроводников, что является аналитическим сигналом. Датчики такого типа легли в основу коммерчески реализуемого прибора Aeonose [113–115], одним из направлений применения которого является диагностика рака легких. Не менее интересной представляется разработка новых уникальных сенсорных систем [116–118].

Привлекают внимание также хеморезистивные сенсорные системы на базе различных типов наноматериалов, как правило, сферических наночастиц металлов либо одностенных углеродных нанотрубок, покрытых различными органически функционализированными группами [88, 119, 120]. Механизм работы подобных сенсорных систем основан на реакции аналитов с органически функционализированными группами, что приводит к изменению связей между проводящими наноматериалами и, как следствие, изменению проводимости.

В литературе представлены результаты работ различных исследовательских групп, посвященных диагностике легочных заболеваний с использованием

коммерческого газоанализатора Cyranose 320, состоящего из 32 сенсоров на основе проводящих полимеров [121–124]. Аналитическим сигналом является изменение сопротивления в результате абсорбции ЛОС на поверхности сенсора, которую покрывают сорбционными материалами, селективными к различным ЛОС.

Отличия в профиле ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых людей можно фиксировать с применением сенсорных систем типа электронный нос на основе пьезосенсоров, модифицированных различными типами сорбционных материалов, как правило, металлопорфиринов [68, 125, 126]. При взаимодействии с пробой ЛОС адсорбируются на поверхности покрытия, изменяя частоту колебания пьезокварцевого резонатора, что является аналитическим сигналом.

Интересной альтернативой к перечисленным выше сенсорным системам является колориметрический «электронный нос» на основе химически чувствительных сенсоров, меняющих цвет при взаимодействии с ЛОС [127–129]. Ввиду большого числа химических индикаторов такие сенсорные системы способны реагировать на довольно широкий круг ЛОС в выдыхаемом воздухе. Результат может быть оценен как визуально, так и с применением спектрометра.

Преимущества и недостатки наиболее распространенных типов сенсорных систем представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Преимущества и недостатки сенсорных систем, применяемых для анализа выдыхаемого воздуха

Сенсорная система	Преимущества	Недостатки
Полупроводниковые сенсоры на основе оксидов металлов	Высокая чувствительность и селективность; возможность анализа в режиме реального времени без предварительного концентрирования и хранения образцов	Требуется контроль температуры и влажности образца
Хеморезистивные сенсоры на базе различных типов наноматериалов	Чувствительность; высокая скорость отклика и восстановления обеспечивают экспрессность анализа, однако на результат в большинстве случаев влияет влажность образца	Требуется контроль влажности образца

## Продолжение таблицы 3

Сенсорная система	Преимущества	Недостатки
Проводящие полимеры	Высокая скорость отклика и восстановления, анализ проб при комнатной температуре, широкий спектр сорбционных материалов	Требуется контроль температуры и влажности образца
Пьезокварцевые микровесы	Высокая чувствительность, возможность проведения анализа в режиме реального времени без предварительного концентрирования и хранения образцов, широкий спектр сорбционных материалов	Требуется контроль влажности, температуры, давления, вибрации и наличия агрессивных сред
Колориметрические сенсоры	Простота эксплуатации, менее подвержены влиянию влажности и температуры	Нечувствительны к углеводородам, низкая чувствительность, сложно подобрать детектирующие элементы и фазы

Выдыхаемый воздух содержит множество компонентов различной природы, ввиду чего некоторые исследователи применяют комбинированные сенсорные системы, сочетающие в себе различные типы датчиков [130, 131]. Сочетания различных типов сенсоров в одном устройстве может обеспечить большую информативность анализа, однако необходимо учитывать особенности работы каждого из типов сенсоров.

Использование сенсорных систем в качестве инструмента обнаружения рака легких в выдыхаемом воздухе – весьма перспективный подход ввиду высокой производительности, в некоторых случаях отсутствия необходимости подготовки проб, простоты в использовании и невысоких требований к квалификации персонала. Однако сенсорные системы в большинстве случаев перекрестно реагируют на множество ЛОС пробы, что существенно затрудняет идентификацию и может привести к ошибочной интерпретации данных.

## 1.3 Результаты исследований различными методами по идентификации биомаркеров рака легких

### 1.3.1 Газовая хроматомасс-спектрометрия

Наибольшее количество исследований, посвященных идентификации биомаркеров рака легких в выдыхаемом воздухе выполнено с применением метода ГХ-МС. Одна из основных исследовательских групп, работающих в данном направлении – группа ученых из США под руководством М. Филлипса. Для анализа проб выдыхаемого воздуха применяли ГХ-МС с предварительным концентрированием аналитов в сорбционной трубке. Публикационная активность данной исследовательской группы по данной тематике наблюдалась с 1997 по 2015 гг. [77, 87, 101, 129]. За этот период было разработано специальное устройство для отбора проб альвеолярного воздуха, оптимизированы параметры отбора и концентрирования проб [75], после чего оптимизированные условия применили для анализа двух достаточно больших групп больных и здоровых людей. Для обработки полученных данных применяли различные методы статистической обработки, в том числе был разработан новый метод статистической обработки (взвешенный цифровой анализ) [101]. В последней работе, посвященной анализу выдыхаемого воздуха для диагностики рака легких, выполнены слепое тестирование и оценка эффективности применения разработанного подхода в качестве дополнения к КТ [77]. Анализ публикаций этих авторов позволяет отметить, что от статьи к статье значительно варьируются как параметры, рассматриваемые в качестве биомаркеров (соединения или ионы, находящиеся во временном интервале хроматограммы), так и перечень рассматриваемых биомаркеров (таблица 4). Также по мере развития работы наблюдается снижение производительности диагностических моделей, т. е. по мере увеличения числа участников исследования, которая на последнем этапе составила 68–70%.

Исследовательская группа польских ученых также внесла значительный вклад в развитие данного направления [48, 53, 55, 103, 132]. Работа выполнена на

двух различных масс-анализаторах: квадрупольном и времяпролетном. Исследовали как альвеолярный, так и выдыхаемый воздух. Можно заметить изменение температурных режимов, изменение условий подготовки проб, в исследованиях принимали участие разные группы добровольцев, кроме того, перечень предполагаемых биомаркеров неоднороден. Несомненно, стоит отметить большой объем работы с точки зрения не только качественного, но и количественного анализа: во многих из представленных публикаций приведены данные определения многих ЛОС в выдыхаемом воздухе, чем отличаются далеко не все работы. К предполагаемым биомаркерам относят спирты, альдегиды, кетоны, ароматические соединения, предельные углеводороды и др.

Несколько публикаций представлены итальянской группой исследователей из Пармы [49, 52, 133]. В качестве биомаркеров рассматривали весь профиль ЛОС и профиль альдегидов. Среди повторяющихся биомаркеров выделены 2-метилпентан, гексан, этилбензол и гептаналь. В качестве потенциальных биомаркеров альдегиды неоднократно рассматривали и другие исследовательские группы [51, 97]. Во всех работах гексаналь, октаналь и нонаналь относят к биомаркерам рака легких, в двух из трех отмечают пентаналь, гептаналь, октаналь и нонаналь [49, 52, 133].

Результаты работ большинства остальных исследовательских групп представлены в единичных публикациях (таблица 4). В целом можно отметить значительную вариативность исследований как с точки зрения перечня биомаркеров, так и относительно применяемых условий анализа, количества задействованных в исследовании добровольцев, подходов к обработке данных и общего дизайна эксперимента.

Таблица 4 – Результаты ГХ-МС анализа выдыхаемого воздуха исследовательскими группами, полученные для идентификации биомаркеров рака легких

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые [другие патологии]		
О-толуидин; анилин	ТД (Тенакс ТА) ГХ-МС (CP Wax-57 CB)	14 (59-70)	17 (25-70)	Тест Манна-Уитни	[45]
Стирол; 2-метилгептан; 2,2,4,6,6-пентаметилгептан; декан; пропилбензол; ундекан; метилциклопентан; 1-метил-2-пентилциклопентан; трихлорфторметан; бензол; 1,2,4-триметилбензол; изопрен; 3-метилоктан; 1-гексен; 3-метилнонан; 1-гептен; 1,4-диметилбензол; 2,4-диметилгептан; гексаналь; циклогексан; 1-метилэтиленбензол; гептаналь	ТД (Карботрап С, Карботрап, Карбосив SIII) ГХ-МС (HP5MS)	60 (68.0)	48 (61.0)	ДА (чувствительность – 71.7, специфичность – 66.7)	[46]
Бутан; 3-метилтридекан; 7-метилтридекан; 4-метилоктан; 3-метилгексан; гептан; 2-метилгексан; пентан; 5-метилдекан	ТД (Карботрап С, Карбопак В) ГХ-МС (HP5MS)	67 (66.0)	41(69.0)	ДА (чувствительность – 89.6, специфичность – 82.9)	[85]

Продолжение таблицы 4

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые [другие патологии]		
Изопрен; 2-метилпента; пентан; этилбензол; триметилбензол; толуол; бензол; гептан; декан; стирол; октан; пентаметилгептан	ТФМЭ (CAR / PDMS) ГХ-МС (EquityTM-1)	36	50	Мультиномиальная логистическая регрессия (чувствительность – 72.2, специфичность – 87.8)	[49]
1,5,9-триметилциклодекатриен; 2,2,4-триметилпентан-1,3-диилдиизобутират; 4-этоксиэтилбензоат; 2-метил-1-(1,1-диметилэтил)-2-метил-1,3-пропандиоловый эфир пропановой к-ты; 10,11-дигидро-5Н-добенз- (В, F) – азепин; 1,4-дион, 2,6-бис (1,1-диметилэтил) -2,5-циклогексадиен; 1,1-оксис-бензол; 2,5-диметилфуран; 2,2-диэтил-1,1-бифенил; 2,4-диметил-3-пентанон; транс-кариофиллен; 2,3-дигидро-1,1,3-триметил-3-фенил-1Н-инден; 1-пропанол; 4-метилдекан; 1,2- диэтиловый эфир бензолдикарбоновой кислоты; 2,5-диметил-2,4-гексадиен	ТД (Карботрап С, Карбопак В) ГХ-МС (HP5MS)	193 (66.0)	211 (67.0)	Нечетная логика (чувствительность – 84.6, специфичность – 80.0)	[86]

Продолжение таблицы 4

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	РЛ		
<p>2-Пропанол; 4-пентен-2-ол; 1,1,2-трихлор-1,2,2-трифторэтан; 2-метокси-2-метилпропан; 1-(метилтио)-, (E)-1-пропен; 2,3-гексадион; 5,5-Диметил-1,3-гексадиен; 2,3-дигидро-4-метил-1Н-индиен; камфора; 1,7,7-диметил-, (1S)-бицикло[2,2,1]гептан-2-он; 4-триметил-3-циклогексен-1-метанол; 5-изопрופןил-2-метил-7-оксабицикло[4,1,0]гептан-2-ол; изометиловый ионон; 2,2,7,7-тетраметилцикло[6.2.10(1.6)]ундек-4-ен-3-он; 2,2,4-триметил-1,3-пентандиол диизобурат; 4-этоксипропилбензоат; 5-этиловый эфир бицикло[3.2.2]нонан-1,5-дикарбоновой кислоты; 2,2,4-триметил-3-карбоксиизопропил, изобутиловый эфир пентановой кислоты; 2-метил-1-(1,1-диметилэтил)-2-метил-1,3-пропандиоловый эфир пропановой кислоты; 3,3,6,6-тетрафенил-1,2,4,5,-тетроксан; бензофенон; 2,6-бис(1,1-диметилэтил)-4-этилендиен; 2-[(2-этокси-3,4-диметил-2-циклогексен-1-илиден)метил]-фуран; 1,1-(1,2-циклобутандиил)бис-цис-бензол; 1,1-[1-(этилтио)пропилдиен], бис-бензол; 1,2,3,4-тетрагидро-9-пропил-антрацен; 2-этил-9,10-антрацендиол; 1,1-этилендиен-бис(4-этил-бензол</p>	<p>ТД (Карботрап С, Карбопак В) ГХ-МС (HP5MS)</p>	<p>193 (66.0)</p>	<p>211 (67.0)</p>	<p>1. Взвешенный цифровой анализ. (чувствительность – 84.5 специфичность – 81.0) 2. Множественная регрессия. (чувствительность – 68.4 специфичность – 73.5)</p>	<p>[101]</p>

Продолжение таблицы 4

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые [другие патологии]		
1-Пропанол; 2-бутанон; 3-бутин-2-ол; бензальдегид; 2-метил-пентан; 3-метил-пентан; пентан; гексан	ТФМЭ (CAR/PDMS) ГХ-МС (CP-Porabond-Q)	65 (63.0)	31 (38.0)	Метод Алана Агрести и Брайана Каффо	[132]
А: 2-бутанон; бензальдегид; 2,3-бутандион; 1-пропанол; В: 3-гидрокси-2-бутанон; 3-бутин-2-ол; 2-метилбутан; 2-метил-2-бутен; ацетофенеон; 1-циклопентен; метилпропилсульфид; тетраметилмочевина; пентан; 1-метил-1,3циклопентадиен; 2,3-диметил-2-бутанол; С: 1,2,3,4-тетрагидро-изохинолин; 3,7-диметилундекан; циклобутилбензол; бутилацетат; этиленамин; ундекан				А: соединения найдены только у больных РЛ В, С: соединения присутствуют в выдыхаемом воздухе здоровых людей, их конц. не более чем на 15% больше, чем в окр. воздухе (чувствительность А,В,С – 52.0, 71.0, 80.0 специфичность А,В,С – 100.0)	[103]
Пентаналь; гексаналь; октаналь; нонаналь	ТФМЭ - (дериватизация на волокне PDMS/DVB) ГХ-МС (MDN-5S)	12 (55-81)	12 (22-42)	Критерий Краскела-Уоллиса	[51]

Продолжение таблицы 4

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые [другие патологии]		
Нонаналь; гексаналь; октаналь; гептаналь; бутаналь; пентаналь; пропаналь	ТФМЭ (дериватизация на волокне PDMS/DVB) ГХ-МС (HP-5MS)	40 (67.0)	38 (49.0)	ДА чувствительность – 90.0, специфичность – 92.1	[52]
1-Бутанол; ацетоин	ТФМЭ (CAR/PDMS) ГХ-МС (Rxi-5MS)	43 (58.0)	41 (48.0)	Критерий суммы рангов Уилкоксона	[56]
Пропан; 2-пропеналь; сероуглерод; 2-пропанол; этилбензол; стирол	ТФМЭ (CAR-PDMS) ГХ-МС (CP-Porabond-Q)	23 (51-78)	31 (20-58)	Тест Манна-Уитни, факторный анализ	[50]
Бутаналь; 2-бутанон; этилацетат; этилбензол; 2-пентанон; 1-пропанол; 2-пропанол	ТФМЭ (CAR-PDMS) ГХ-МС (CP-Porabond-Q)	29	44	Критерий Краскела-Уоллиса	[53]
1-Октен	ТФМЭ (DVB/CAR/PDMS) ГХ-МС (SLC-5MS)	-	-	Критерий суммы рангов Уилкоксона	[89]

Продолжение таблицы 4

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые [другие патологии]		
Гексадеканаль; эйкозан; 5-(2-метил-) пропилнонан; 7-метилгексадекан; 8-метилпентадекан; 2,6- ди-терт-бутил-, 4-метилфенол; 2,6,11-триметилдодекан;3,7-диметилпентадекан; нонадекан; 8-гексилпентадекан; 4-метилтетрадекан; 2,6,10-триметилтетрадекан; 5-(1-метил-)пропилннан; 2-метилнафталин; 2-метилгендеканаль; нонадеканол; 2-пентадеканон; тридеканон; 5-пропилтридекан; 2,6-диметилнафиалин; тридекан; 3,8-диметилгендекан; 5-бутинонан	ТФМЭ (PDMS) ГХ-МС (Rtx-1)	85 (62.0)	88 (45.0)	ДА (чувствительность – 96.5, специфичность – 97.5)	[69]
2-бутанон; 2-гидрокси-2-бутанон; 2-гидроксиацетальдегид; 4-гидроксигексеналь	Силиконовый микрореактор, МС-ИЦР ПФ	107 (65.0)	88 (42.0)	Критерий суммы рангов Уилкоксона	[134]
2-метил-1-пентен; 2-гексанон; 3-гептанон; стирол, 2,2,4-триметилгексан – уменьшились после операции	ТФМЭ (DVB/CAR/PDMS) ГХ-МС (SLB-5MS)	-	-	Критерий суммы рангов Уилкоксона, критерий Краскела-Уоллиса	[88]
Этанол; 2-бутанон; 2,3-бутандиол; 9-тетрадекен-1-ол; октен-производные; циклогептан производные; циклононан производные	ТФМЭ (DVB/PDMS) ГХ-МС (VF-5 MS)	11	10	-	[90]

Продолжение таблицы 4

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые [другие патологии]		
Октан; нонан; 2,3-бутандион	ТД (Тенакс ТА, Карбоксен 569, Карбоксен 1000) ГХ-МС (PoraBond Q)	36 (42-79)	28 (22-87)	Критерий Краскела-Уоллиса	[91]
Диметилсульфид; 1,4-пентадиен; этилацетат; метилциклопентан; 2-пропанол; изобутан; 2,4-диметилпентан	ТФМЭ (CAR/PDMS) ГХ-МС (P-Porabond-Q)	108 (38-87)	121 (20-73)	Дерево решений, ИНС (чувствительность – 74.0, специфичность – 73.0)	[47]
5-(2-метил-)пропил-нонан; 2,6-ди-tert-бутил-, 4-метил-фенол; 2, 6, 11-триметил-додекан; гексадеканаль; 8-гексил-пентадекан	ТФМЭ (PDMS), ТД (Тенакс ТА, Карбосив S-III) ГХ-МС	79 (63.0)	38 (52.0)	МГК (производительность для каждого ЛОС: 84.5, 72.4, 84.6, 100.0, 67.6)	[83]
Выдыхаемый воздух: пентан; 2-метилпентан; гексан; этилбензол; гептаналь; транс-2-ноненаль Конденсат выдыхаемого воздуха: пероксид водорода	ТФМЭ (CAR/PDMS) ГХ-МС (HP-5MS)	71 (68.0)	67 (64.0) [доброкачественные опухоли]	Критерий Краскела-Уоллиса, логистическая регрессия	[133]
Бутан; 2-метил-бутан; 4-метил-октан; пропан; 2-пентанон; пропаналь; 2,4-диметил-гептан; пропен	ТФМЭ (CAR/PDMS) ГХ-МС (CP-Porabond-Q)	123 (36-87)	217 (20-55)	5 моделей ИНС (чувствительность – 79.0, 79.0, 54.0, 45.0, 59.0, специфичность – 52.0, 52.0, 79.0, 81.0, 83.0)	[55]

Продолжение таблицы 4

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые [другие патологии]		
500 ионов в диапазоне времени от 1,500 до 2,500 секунд	ТД (Карботрап С, Карбопак В) ГХ-МС (HP5MS)	Построение модели 100 (67.0)	Построение модели 35 (44.0)	С-статистика, взвешенный цифровой анализ, тестирование в 1 лаборатории: (чувствительность – 68.0 специфичность – 68.4) тестирование во 2 лаборатории (чувствительность – 70.1, специфичность – 68.0)	[77]
		Проверка в другой лаборатории 75 (66.0)	Проверка в другой лаборатории 19 (49.0)		
Пентан; гексан; гептан; октан; додекан; 3-метилпентан; циклогексан; бензол; этилбензол; пропилбензол; пропаналь; бутаналь; гексаналь; октаналь; нонаналь; деканаль; 1-бутанол; 2-бутанон; 2-пентанон	ТФМЭ (CAR/PDMS) ГХ-МС (VF-624ms)	37 (66.0)	23 (61.0)	Тест Манна-Уитни, ДА (чувствительность – 84.0, специфичность – 78.0)	[87]
Нонановая кислота	ТД (Тенакс ТА+ Карбограф + Карбоксен) ГХ-МС (DB1)	81 (68.0)	89 (49.0)	Тест Манна-Уитни, (чувствительность – 32.0, специфичность – 88.0)	[72]
Синильная кислота; метанол; ацетонитрил; изопрен; 1-пропанол	ТД ГХ-МС (DB1)	107	27 +78 искусственно созданных	Метод опорных векторов (чувствительность – 92.5, специфичность – 76.0)	[135]

Продолжение таблицы 4

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые [другие патологии]		
3-этилтолуол; 1,2,3-триметилбензол, пропилбензол; пропилциклогексан; индан; 1-метил-3-пропилбензол; о-ксилол; 4-метил-2-гептанон; метилциклогексан	ТД (Тенакс ТА) ГХ-МС (Rtx-5)	58 (51.0)	125 (61.0) [доброкачественная опухоль]	ROC анализ, ИНС (чувствительность – 80.8, специфичность – 84.0)	[76]
Генейкозан; нонадекан; пентадекан; гидроксibenзол; додекан; аконитил ангидрид; тиазолин; 8-метилгептадекан; т-тетракозан	ТФМЭ (PDMS) ГХ-МС (Rtx-5)	108 (61.0)	82 (51.0) [доброкачественная опухоль]	ROC анализ, ИНС по РЛ и лоброкач опухоли (чувствительность – 75.6, специфичность – 78.9)	[73]
Гексаналь; гептаналь; октаналь; нонаналь	ТФМЭ (металлорганический каркас ZIF-7) ГХ-МС (KB-5)	6	6	Сравнение средних значений: у пациентов с РЛ средние выше	[97]
Для отбора значимых биомаркеров 2 подхода, всего 37 соединений, из них 7 определенных обоими подходами: фурфураль; уксусная кислота; фениловый эфир; гептадекан, 2-метил-; 1-метил-2-метиленциклогексан; 7-оксабицикло[4.1.0]гептан, 2-метилен-; 4-ундекен, 5-метил-, (E)-, анетол	ТД (Тенакс GR, Карбопак В) ГХ×ГХ ВП-МС (Rxi-5Sil+ ВРХ-50)	15 (62.0)	14 (58.0)	1 подход: Критерий Фишера, МГК, кластерный анализ; 2 подход: случайный лес, МГК	[65]

Продолжение таблицы 4

Биомаркер	Метод	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые [другие патологии]		
3-Метилгексан; 2,5-диметилфуран; пропил ацетат; 2,4-диметилгептан; 1,3,5,7- Циклооктатетраен; изопрроилбензол; стирол; β-пинен; 2,2,4,6,6-пентаметилгептан; 1,2,3-триметилбензол; октналь; 1,3-дихлорбензол; 1-этил-3-метил-бензол; 2,2,4,4,6,8,8-гептаметил-нонан; 3,7-диметилдекан; декан; фенилпропин; 2-этилгексен; 1-этил-2,3-диметил-бензол; 15,19-диметил-тритриаконтан; изоамилацетат; гексаметилдисилоксан	ТД (Тенакс ТА) ГХ-МС (Rtx-5)	60 (62.0)	176 (64.0)	Градиентный бустинг деревьев решений (чувствительность – 83.0, специфичность – 85.0)	[82]
Пики с m/z меньше 500 (32 500 в каждом образце)	ФИАД-ВП-МС	139 (60.1)	289 (55.5)	Метод опорных векторов (тестовые данные (чувствительность – 93.0, специфичность – 96.7 Валидация на новых данных: (чувствительность – 100.0, специфичность – 92.9)	[136]

Примечание – РЛ – рак легких ТД – термическая десорбция, ДА – дискриминантный анализ, МС-ИЦР ПФ – масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье, ВП-МС – времяпролетный масс спектрометр, ИНС – искусственные нейронные сети, МГК – метод главных компонент, ФИАД – фотоионизация при атмосферном давлении

## 1.3.2 Масс-спектрометрия

Другие методы масс-спектрометрии не нашли широкого применения для диагностики рака легких по выдыхаемому воздуху, однако в литературе представлены некоторые публикации (таблица 5). В случае СИП применяют сочетание данного метода с МКК. В двух из трех представленных работ [137, 138] пики не идентифицировали, а в работе [105] ЛОС идентифицировали с помощью базы данных. В одной из ранних публикаций [137] авторы построили модель, классифицирующую образцы выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и здоровых людей без ошибок, однако в более поздних работах чувствительность и специфичность моделей стали гораздо ниже.

Таблица 5 – Результаты анализа выдыхаемого воздуха различными исследовательскими группами для идентификации биомаркеров рака легких с применением МКК СИП, РПП и МС ВИП

Биомаркер	Метод	Участники исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые		
23 пика	МКК СИП	32 (65.1)	54 (46.0)	ДА (производительность – 100.0)	[137]
Додекан; 2-гексанол (2-метилбутилацетат); этилбензол; нональ (циклогексанон); гексаналь; гептаналь; 3-метил-1-бутанол; 3-метил-1-бутанол; изопропиламин	МКК СИП	50 (32.0)	39 (68.0)	Критерий суммы рангов Уилкоксона, дерево решений (чувствительность – 100.0, специфичность – 76.0)	[105]
20 пиков	МКК СИП	56 (69.9)	52 (51.2)	Логистическая регрессия по методу Лассо (чувствительность – 76.8, специфичность – 65.4)	[138]
Формальдегид; 2-пропанол	РПП	17 (62.4)	170 (41.0)	Критерий суммы рангов Уилкоксона	[139]
Изопрен; ацетон; метанол	РПП	220 (64.4)	441 (54.0)	Критерий Краскела-Уоллиса	[103]

## Продолжение таблицы 5

Биомаркер	Метод	Участники исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
		РЛ	Здоровые		
Ионы с m/z 43; 45; 46; 59; 60, 61	РПП	30 (54.7)	30 (34.3)	Тест Манна-Уитни, ДА (чувствительность – 70.0, специфичность – 90.0)	[140]
50 ЛОС	МС ВИП	148 (64.5)	168 (31.4)	Критерий суммы рангов Уилкоксона, бустинг деревьев решений (чувствительность – 96.0, специфичность – 88.0)	[67]

Среди работ с применением масс-спектрометрии с реакцией переноса протона диагностическую модель построили только в работе [140] на основе анализа выдыхаемого воздуха 30 пациентов с раком легких и 30 здоровых людей, где в качестве параметров рассматривали неидентифицированные ионы; производительность составила 80%. В других работах [103, 139] представлены биомаркеры, содержания которых статистически значимо отличаются в пробах исследуемых групп участников: перечни биомаркеров, представленные в разных работах не пересекаются (таблица 5). Несмотря на рост числа публикаций с применением метода МС ВИП в различных областях и активное обсуждение перспектив применения данного метода для диагностики рака легких по выдыхаемому воздуху, конкретная работа по применению данного метода в диагностике рака легких опубликована лишь в 2021 г. [67]. Диагностическая модель была построена на основе анализа относительно большой группы людей (148 пациентов с раком легких и 168 здоровых добровольцев), чувствительность и специфичность составили 96.0% и 88.0% соответственно.

### 1.3.3 Сенсорные системы

Среди сенсорных систем наиболее широкое применение в исследованиях, посвященных диагностике рака легких по выдыхаемому воздуху, нашел

коммерческий «электронный нос» на основе нанокompозитной матрицы с 32 полимерными датчиками Cyganose 320. В одной из наиболее ранних работ [60] применение данного «электронного носа» оказалось эффективным для дифференциации людей на больных и здоровых, что подтверждено на одной и той же выборке дважды при повторении эксперимента с 10-дневным временным интервалом; это доказывает стабильность результатов и отсутствие влияния внешних факторов. Однако в другом исследовании [123] специфичность оказалась весьма низкой – менее 50%. Исследовательская группа из Латвии также опубликовала результаты работ с «электронным носом» Cyganose 320 [124, 141]. При рассмотрении относительно небольшой выборки пациентов с раком легких и здоровых людей достичь высокой специфичности им не удалось. Но на более обширной выборке и при рассмотрении в качестве альтернативной онкологической больной группы не только добровольцев без легочных заболеваний, но и пациентов с доброкачественными опухолями и другими легочными заболеваниями, производительность модели составила более 90% как при рассмотрении только курящих больных и здоровых, так и некурящих. Стоит отметить, что в исследовании модель построена на всем наборе данных, без разделения на обучающую и тестовую выборки.

Среди металлооксидных полупроводниковых сенсоров наиболее распространено применение коммерческого «электронного носа» Aeonose. Ученые из Медицинского центра университета Маастрихта, используя данный «электронный нос», построили диагностическую модель с применением нейронных сетей и показали на тестовой выборке, что с применением Aeonose удается правильно классифицировать 87% образцов. Однако в [117], где в эксперименте принимала участие более обширная группа людей, специфичность оказалась низкой (44.1%), при добавлении в модель клинических параметров специфичность удалось повысить лишь до 55.9%. С применением некоммерческих электронных носов на основе металлооксидных полупроводниковых сенсоров можно отметить разные результаты с общей производительностью от 75.5 [142], 88.8 [143] до 97.5% [117].

Не менее успешно показали себя различные типы электронных носов на основе наночастиц (таблица 6), но во всех исследованиях принимали участие небольшие группы добровольцев. Для подтверждения полученных ранее результатов требуется значительное расширение выборки.

Наибольший вклад в развитие исследований с применением колориметрического «электронного носа» внесли Маззоне с соавт. [74, 129]. В работе [74] приведены результаты проанализированного выдыхаемого воздуха 97 пациентов с раком легких и 182 здоровых людей. Производительность модели составила 79%. Авторы показали, что дополнительное использование клинических параметров в качестве предикторов способно значительно повысить производительность.

Применение комбинированных сенсоров хорошо показало себя на относительно небольших выборках [130, 131], однако полученные результаты необходимо подтвердить на большем массиве данных (таблица 6).

Исходя из представленных выше результатов анализа выдыхаемого воздуха различными методами для разработки способа диагностики рака легких видно, что на сегодняшний день не обнаружены уникальные биомаркеры, по наличию или отсутствию которых можно было бы надежно ставить диагноз. Интерес исследователей сосредоточен на выявлении комбинации компонентов, содержание которых статистически значимо отличается у пациентов с раком легких и у здоровых людей. Из всех рассмотренных методов анализа выдыхаемого воздуха ГХ-МС остается наиболее подходящим для решения поставленной задачи, так как позволяет идентифицировать все компоненты пробы, что особенно необходимо для выявления достоверного перечня биомаркеров среди множества аналитов. Тем не менее, оборудование для этого метода является громоздким, анализ зачастую длителен, а для обработки результатов необходим высококвалифицированный персонал. Однако применение ГХ-МС в клинической практике могло бы быть реализовано за счет возможности длительного хранения проб после отбора и концентрирования, что позволит создать единые центры анализа проб, куда будут поступать образцы, полученные в различных отдаленных учреждениях. Другим

недостатком ГХ-МС является необходимость стадий отбора, концентрирования и хранения образцов, при выполнении которых возможна контаминация пробы и ее частичная потеря.

Таблица 6 – Результаты анализа выдыхаемого воздуха в целях идентификации биомаркеров рака легких с применением различных типов «электронного носа»

Тип сенсорной системы	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
	РЛ	Здоровые [другие патологии]		
Cyranose 320	10 (45–80)	10 (45–80)	МГК, ДА, (образцы собраны 2 раза через 10 дней, производительность: 1 раз – 90.0, 2 раз – 80.0)	[60]
Cyranose 320	38 (64.2)	39 (62.5) [ХОБЛ]	МГК, (чувствительность – 94.0, специфичность – 13.0)	[123]
Cyranose 320	165 (63.8)	79 (37.1)	Метод опорных векторов (чувствительность – 97.8, специфичность – 68.8)	[141]
Cyranose 320	252 (68.7)	223 (53.8)	Логистическая регрессия: РЛ и здоровые некурящие (чувствительность – 91.4, специфичность – 96.0); РЛ и здоровые курящие (чувствительность – 94.2, специфичность – 94.3)	[124]
Aeonose	60 (65.0)	107 (63.0)	ИНС (чувствительность – 88.0, специфичность – 86.0)	[114]
Aeonose	138 (67.1)	143 (62.1)	ИНС (чувствительность – 94.2, специфичность – 44.1); многомерный регрессионный анализ (+клинические параметры) (чувствительность – 95.7, специфичность – 59.7)	[115]
Металлооксидные полупроводниковые сенсоры	37 (63.3)	48 (38.7)	ИНС (чувствительность – 79.0, специфичность – 72.0)	[142]
Металлооксидные полупроводниковые сенсоры	65 (65.0)	53 (56.0)	Логистическая регрессия, метод ближайших соседей, метод опорных векторов (чувствительность – 95.0, специфичность – 100.0), случайный лес (чувствительность – 90.0, специфичность – 100.0), линейный ДА (чувствительность – 95.0, специфичность – 81.2)	[117]

Продолжение таблицы 6

Тип сенсорной системы	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
	РЛ	Здоровые [другие патологии]		
Кварцевые микровеса, покрытые молекулярными пленками металлопорфиринов	35	18	ДА на основе частичных наименьших квадратов (чувствительность – 100.0, специфичность – 94.4)	[125]
Кварцевые микровеса с сенсорами, покрытыми молекулярными пленками металлопорфиринов	28 (62.0)	36 (63.0)	ДА, (чувствительность – 85.7, специфичность – 100.0)	[126]
Кварцевые микровеса, покрытые молекулярными пленками металлопорфиринов	70 (67.0)	76 (61.0)	ДА на основе частичных наименьших квадратов (чувствительность – 81.0, специфичность – 91.0)	[68]
Кварцевые микровеса с золотыми электродами, покрытыми антоцианом	23 (62.0)	77 (62.0)	МГК, ДА на основе частичных наименьших квадратов (чувствительность – 86.0, специфичность – 95.0)	[144]
Органически функционализированные наночастицы золота	30 (30–75)	59 (20–75)	МГК	[145]
Органически функционализированные сферические наночастицы золота и платины	24	10 [доброкачественная опухоль]	ДА (чувствительность – 100.0, специфичность – 80.0)	[88]

Продолжение таблицы 6

Тип сенсорной системы	Количество участников исследования (возраст)		Статистическая обработка данных (производительность, %)	Ссылка
	РЛ	Здоровые [другие патологии]		
4 хеморезистора на основе одностенных углеродных нанотрубок, покрытых ПАУ и 16 хеморезисторов на основе органически активных сферических наночастиц золота	50 (64.9)	19 (60.8) [доброкачественная опухоль]	ДА (чувствительность – 86.0, специфичность – 96.0)	[89]
Чистые и легированные металлом нанопроволоки WO <sub>3</sub> , во время измерения облучаемые УФ-излучением	32 (59.6)	12 (31.3)	ДА (точность: перекрестная проверка – 99.2, бутстрэп – 98.6)	[70]
36 красителей с разными химическими свойствами	49 (65.0)	94 (56.0)	Случайный лес (чувствительность – 73.3, специфичность – 72.4)	[146]
24 красителя трех типов: металлохромные, кислотнo-основные и сольватохромные	92 (68.9)	137 (58.9)	С-статистика (производительность – 81.1)	[129]
32 красителя трех типов: металлохромные, кислотнo-основные и сольватохромные	97 (66.1)	182 (63.0)	С-статистика (производительность – 79.4–86.1)	[74]
4 электрохимических сенсора, 1 сенсор с нагретой проволокой, 1 каталитический сенсор горючих газов и 8 металлоксидных полупроводниковых сенсоров	24 (63.6)	28 (48.2)	Нечеткий ДА (чувствительность – 91.6, специфичность – 91.7)	[130]
5 электрохимических сенсоров, 1 сенсор с нагретой проволокой и 12 металлоксидных полупроводниковых сенсоров	46 (58.8)	41 (34.5)	Метод опорных векторов (чувствительность – 97.8, специфичность – 90.2); метод ближайших соседей (чувствительность – 100.0, специфичность – 75.0); метод логитбуст (чувствительность – 87.0, специфичность – 82.9)	[131]

Устройства типа «электронный нос» значительно проще внедрить в клиническую практику, однако, несмотря на впечатляющую производительность подобных устройств, в некоторых исследованиях (таблица 6) они реагируют на «образ» выдыхаемого воздуха, в котором содержится большое количество экзогенных компонентов, учет которых зачастую весьма проблематичен. Чувствительность «электронного носа» может быть настроена на определенные ЛОС, но ввиду отсутствия согласованности по идентификации компонентов – предполагаемых биомаркеров, в качестве детектора в подавляющем большинстве подобных устройств лежат неселективные сенсоры, реагирующие на множество компонентов одновременно. Это, с одной стороны, позволяет получить общее представление об отличиях профилей ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых людей, с другой стороны, не дает ответа на вопрос: чем обусловлены эти изменения, что сопряжено с ложной интерпретацией получаемых результатов. Оптимальный вариант применения таких устройств может быть достигнут только после установления достоверного перечня биомаркеров и настройки чувствительности сенсоров на определенные соединения.

#### 1.4 Возможные причины неоднозначности результатов, полученных различными исследовательскими группами

##### 1.4.1 Дифференцирование гистологического типа и стадии заболевания по составу выдыхаемого воздуха

Вариативность результатов различных исследовательских групп может быть обусловлена не только количеством участников исследования и различием групп больных и здоровых людей, но и отличиями внутри групп. Многие исследователи строят классификационные модели по показателю «норма–патология», однако состав группы «патология» значительно варьируется в разных исследованиях по количеству пациентов с разным гистологическим типами и стадией заболевания. Метаболизм различных гистологических типов опухоли могут существенно

отличаться, а некроз и скорость распространения опухоли на разных стадиях существенно варьируются, что может отражаться на составе выдыхаемого воздуха. Некоторые исследователи изучали отличия состава выдыхаемого воздуха и содержаний некоторых ЛОС в зависимости от гистологического типа и стадии опухоли.

Повышенное содержание 1-бутанола и ацетона в группе пациентов с аденокарциномой по сравнению с плоскоклеточным раком наблюдали в [56] при рассмотрении профиля ЛОС в выдыхаемом воздухе в зависимости от гистологического типа заболевания. В работе [95] показано, что содержание 4-гидрогексеналя отличается у пациентов с плоскоклеточным раком и аденокарциномой, а 4-гидроксиноненаля и пентаналя – в группах с мелкоклеточным раком легких (МРЛ) и немелкоклеточным раком легких (НМРЛ). Пациентов с МРЛ и НМРЛ в исследовании [70] классифицировали с применением «электронного носа» с точностью 88.4%, а пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком – 77.5%. При сопоставлении пациентов с различными типами рака легких и здоровых людей Маззоне с соавт. [74] добились точности модели от 70 до 81% при сравнении НМРЛ и здоровых, от 76 до 89% при сравнении МРЛ и здоровых и от 58 до 88% при сравнении плоскоклеточного рака легких (ПРЛ) и аденокарциномы. Корт с соавт. [147] сравнивали результаты анализа выдыхаемого воздуха пациентов с разными гистологическими типами и здоровых людей с подтвержденным отсутствием заболевания. Лучшее всего удается классифицировать МРЛ и здоровых людей (чувствительность – 88.9%, специфичность – 80.0%), при сравнении здоровых людей с пациентами с аденокарциномой и ПРЛ чувствительность и специфичность составили 81.5, 80.8% и 53.2%, 72.5%. Однако в исследовании [55] отличий в профилях ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с различными гистологическими типами не обнаружено.

В работе Филипс с соавт. [101] показали, что стадия заболевания не зависит от параметров, включенных в диагностическую модель. Отсутствие взаимосвязи стадии заболевания с профилем ЛОС в выдыхаемом воздухе также

продемонстрировано в исследованиях [55, 56, 69]. В работе [95] отмечается, что концентрация 2-бутанона в группах онкобольных со 2-ой и 4-ой стадиями НМРЛ значительно выше, чем с 1-ой. С применением ГХ-МС авторы [89] не выявили отличия между ранней и поздней стадиями рака легких, но, используя «электронный нос» на основе наноматериалов, классифицировали раннюю и позднюю стадии с чувствительностью 86% и специфичностью 88%. В работе [74], с применением колориметрического сенсора, 1-ую и 4-ую стадии заболевания удалось классифицировать с точностью 93.7%.

В работе [105] авторы сопоставляют пробы пациентов с раком легких в зависимости от такого альтернативного параметра, как мутация в гене EGFR: наблюдали повышенное содержание додекана в выдыхаемом воздухе пациентов, у которых обнаружена мутация в гене EGFR. Данный показатель также может обуславливать вариативность внутри группы с раком легких, что необходимо принимать во внимание.

Исходя из представленных результатов, можно отметить: некоторые авторы в своих исследованиях отличия состава проб выдыхаемого воздуха в зависимости от гистологического типа или стадии заболевания отмечали достаточно четко, в других исследованиях не наблюдали никаких отличий. Данная проблема может быть решена только при проведении масштабного исследования с исчерпывающим количеством образцов для каждой из рассматриваемых групп.

#### 1.4.2 Биомаркеры рака легких в тканях и клеточных линиях

Другой проблемой, которая может частично объяснить неоднородность результатов, полученных различными исследовательскими группами, является недостаточная на сегодняшний день изученность метаболических путей происхождения биомаркеров, вследствие чего некоторые экзогенные компоненты могут быть ошибочно отнесены к перечню биомаркеров. Косвенным подтверждением эндогенной природы компонентов, присутствующих в выдыхаемом воздухе, может быть исследование профилей ЛОС над опухолевыми

тканями и клеточными линиями. Авторы [148] сопоставляли профили ЛОС, содержащихся в выдыхаемом воздухе и клеточных линиях. Обнаружили четыре компонента, характерные для опухолевых клеточных линий, из которых два были идентифицированы как изопрен и ундекан, тогда как в выдыхаемом воздухе содержания 11 ЛОС были характерны для рака легких, среди которых также присутствовали изопрен и ундекан. Профили ЛОС в выдыхаемом воздухе, тканях и клеточных линиях сопоставили в работе [69], где 2-пентадеканон, нонадекан и эйкозан присутствовали во всех трех исследуемых матрицах, а тридекан присутствовал как в выдыхаемом воздухе, так и опухолевых тканях. Подобное исследование проводил Филипак с соавт. [91]. Обнаружено, что концентрации октана в выдыхаемом воздухе, тканях и клеточных линиях повышены в случае рака легких в сравнении с соответствующими здоровыми образцами. Также наблюдали повышенное содержание 2-метилпентана и гексана в случае рака легких во всех матрицах, однако статистически значимое изменение наблюдали только в выдыхаемом воздухе.

В работе [149] сопоставляли профили ЛОС 28 образцов опухолевых тканей и 24 образцов доброкачественных тканей. Диагностическая модель, построенная с применением дискриминантного анализа на основе толуола, 1-пенанола, гексаналя, гептаналя, стирола, 2,3-октандиона и одного неидентифицированного пика, была способна классифицировать образцы опухолевой и доброкачественной тканей с точностью 98%.

Авторы [150] изучали клеточные линии с использованием метода ГХ-МС. Модель, построенная на 12 ЛОС с максимальным вкладом деканала, ацетофенона и 3-бис(1,1-диметилэтил)бензола, оказалась способной классифицировать НМРЛ и МРЛ со 100%-ной чувствительностью и 75%-ной специфичностью, а модель на основе 9 ЛОС с максимальным вкладом в дискриминирующую способность 2-этил-1-гексанола, 1,3-диметилбензола и 1,3-бис(1,1-диметилэтил)бензола – аденокарциному и ПРЛ со 100%-ной чувствительностью и 67%-ной специфичностью. При использовании сенсорной системы на основе наночастиц анализировали те же образцы, за исключением одного образца клеточных линий

ПРЛ. Удалось классифицировать НМРЛ и МРЛ со 100%-ной чувствительностью и 75%-ной специфичностью, а аденокарциному и ПРЛ – с 86%-ной чувствительностью и 100%-ной специфичностью. Сопоставление профилей ЛОС в выдыхаемом воздухе и клеточных линиях проведено в [140] с применением метода РПП. Среди ионов, статистически значимо отличающихся в образцах выдыхаемого воздуха больных и здоровых людей, только содержание иона с  $m/z = 45$  было повышено.

Результаты исследований профилей ЛОС, содержащихся в тканях и клеточных линиях, как и в случае с выдыхаемым воздухом весьма неоднозначны. Причины получения таких результатов могут быть связаны как с вариативностью самих проб, анализируемых в различных исследованиях, так и упущением некоторых важных моментов. Так, например, в публикациях отсутствует описание учета влияния окружающего воздуха, что может привести к рассмотрению экзогенных компонентов как компонентов, выделяющихся из образца. Еще одним недостатком уже выполненных на сегодняшний день исследований является их относительная ненадежность ввиду весьма небольшого объема выборки.

#### 1.4.3 Биомаркеры оценки эффективности лечения рака легких

Во многих исследованиях при сопоставлении групп пациентов с раком легких и здоровых людей указывается, что пациенты еще не проходили лечение. Также имеются работы, где статус лечения не указан, либо отмечено, что пациенты уже получили лечение. С другой стороны, помимо решения задачи диагностики рака легких не менее важной задачей является мониторинг эффективности применяемых методов лечения. Исследование проб выдыхаемого воздуха до и после лечения может служить дополнительным подтверждением того, что изменения содержаний ЛОС действительно обусловлены заболеванием. Некоторые исследовательские группы уже опубликовали результаты работ в данном направлении. В работе [49] наблюдали статистически значимое снижение концентраций изопрена и декана после операции на основе обследования 26

пациентов с НМРЛ. В [94] описано статистически значимое снижение концентраций 2-бутанона, 2-гидроксиацетальдегида и 4-гидроксигексенала после резекции на основе анализа выдыхаемого воздуха 20 пациентов. Авторы [88] анализировали выдыхаемый воздух 10 пациентов с раком легких до и после операции с использованием ГХ-МС и «электронного носа». В случае ГХ-МС концентрации стирола, 2-метил-1-пентена, 2-гексанона, 3-гептанона, 2,2,4-триметилгексана статистически значимо уменьшились после резекции, а на основе результатов анализа с использованием «электронного носа» построена классификационная модель, где образцы были правильно классифицированы с точностью 80%.

Авторы [120], используя сенсоры на основе массива наноматериалов, исследовали изменения в профиле ЛОС в выдыхаемом воздухе в зависимости от реакции на лечение. Группы до и после лечения с положительной реакцией на лечение можно классифицировать с чувствительностью – 93% и специфичностью – 85%, а группы с отрицательной и положительной реакциями на лечение – со 100%-ной специфичностью и 28%-ной чувствительностью. В этом же исследовании образцы выдыхаемого воздуха проанализировали методом ГХ-МС. После лечения наблюдали изменения концентраций стирола,  $\alpha$ -фелландрена, додекана и 4-метилдодекана. В [117] приводятся результаты исследований образцов выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких, полученные до резекции в первое и второе посещения клиники после резекции. Также отбирали образцы выдыхаемого воздуха здоровых людей с такими же временными интервалами. Показано, что образцы выдыхаемого воздуха здоровых людей остаются стабильными, а у 45.2% пациентов с раком легких наблюдали значительные изменения.

#### 1.4.4 Селективность биомаркеров рака легких к другим заболеваниям

Для выявления селективных биомаркеров рака легких большинство исследователей сравнивают профили ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с

раком легких и здоровых людей без каких-либо легочных заболеваний, а наличие других легочных патологий зачастую является исключающим фактором участия в эксперименте. Однако другие легочные заболевания также могут изменять профиль ЛОС, что не учитывается при сравнении больного раком легких и здорового, вследствие чего другие легочные заболевания могут быть ошибочно интерпретированы как рак легких. Другой проблемой является возможность параллельного присутствия у пациента с раком легких других заболеваний, что дополнительно может исказить профиль ЛОС, поэтому при разработке способа диагностики рака легких необходимо учитывать, как селективность заболевания относительно других патологий, так и возможную изменчивость пробы при наличии нескольких патологий одновременно.

Доброкачественные опухоли – это образования, которые невозможно отличить от рака легких при диагностике с помощью КТ, поэтому для установления диагноза в большинстве случаев требуется хирургическое вмешательство, поэтому интерес представляет исследование селективности биомаркеров рака легких по отношению к доброкачественным опухолям. В исследовании [89] сравнивали данные пациентов со злокачественной и доброкачественной опухолями. На основании ГХ-МС-анализа выявили, что содержание 1-октена статистически значимо отличается в исследуемых группах пациентов, с применением «электронного носа» также удалось различить группы с чувствительностью 86% и специфичностью 96%. В работе [88] на основе анализа 10 пациентов с доброкачественной опухолью и 24 пациентов с раком легких построена диагностическая модель со 100%-ной чувствительностью и 80%-ной специфичностью. При сопоставлении групп здоровых людей, пациентов с доброкачественными опухолями и раком легких 96% пациентов с раком легких были идентифицированы правильно [69], в то время, как 34% пациентов с доброкачественной опухолью были отнесены в группу здоровых добровольцев, что показывает селективность алгоритма к раку легких. В исследовании [134] наблюдали повышенные концентрации 2-бутанона, 2-гидроксиацетальдегида, 3-гидрокси-2-бутанона и 4-гидроксигексенала у пациентов с раком легких по

сравнению со здоровыми людьми и с пациентами с доброкачественной опухолью, а в работе [83] такая зависимость наблюдалась для 5-(2-метил)пропил-нонана, 2,6-*ди-трет*-бутил-4-метил-фенола, 2,6,11-триметилдодекана, гексадеканаля, 8-гексилпентадекана. Построенная Корради и соавт. [133] классификационная модель позволила отличить пациентов с раком легких и пациентов с доброкачественной опухолью с относительно невысокой точностью (чувствительность – 60.6%, специфичность – 67.2%). При сравнении групп со злокачественными опухолями, доброкачественными опухолями и здоровыми людьми не удалось выявить значительных отличий между группами с доброкачественными и злокачественными опухолями, однако группу здоровых людей можно отличить от группы с легочными заболеваниями с чувствительностью 75.6–80.8% и специфичностью 78.9–84.0% [76]. В работе [102] сравнивали пациентов с раком легких со здоровыми людьми и с пациентами с образованием по данным КТ, но отрицательной биопсией. Наилучшая производительность при классификации пациентов с раком легких и здоровых людей составила 78.8%, однако при сопоставлении пациентов с раком легких и пациентов с отрицательной биопсией производительность оказалась значительно ниже и составила 52.8%. В исследовании [138] при сопоставлении пациентов с раком легких со здоровыми добровольцами чувствительность и специфичность составили 76.8 и 65.4%, соответственно, а при сравнении пациентов с раком легких и с доброкачественными опухолями – 64.3% и 77.1%.

Поли с соавт. [49] сравнили профили ЛОС пациентов с раком легких, пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), здоровых курильщиков и здоровых некурящих людей: чувствительность модели к каждой из сравниваемых групп находилась в диапазоне 72.2–87.8%. В исследовании [60] профили ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с ХОБЛ и НМРЛ удалось классифицировать с точностью 85%. В работе [72] содержание нонановой кислоты статистически значимо отличалось в группе пациентов с раком легких по сравнению как со здоровыми людьми, так и с пациентами с ХОБЛ. При классификации пациентов с раком легких и ХОБЛ наблюдали [123] достаточно

высокую чувствительность 94.0% при низкой специфичности (13.0%). При сравнении групп пациентов с раком легких, с раком легких и ХОБЛ, с ХОБЛ и здоровых людей почти половина пациентов с раком легких и 2/3 пациентов с ХОБЛ были отнесены к группе пациентов с раком легких и ХОБЛ, в то время как 80% здоровых людей были классифицированы правильно [141]. Те же авторы в своей следующей работе [124] в группу «не рак легких» включили как здоровых, так и пациентов с различными другими легочными патологиями (доброкачественные образования, астма, ХОБЛ, туберкулез и др.), производительность модели при этом составила более 90% как для курильщиков, так и для некурящих. В работе [114] пациенты с ХОБЛ присутствовали как в группе больных раком легких, так и в группе здоровых людей. Производительность построенных моделей увеличилась при добавлении ХОБЛ вместе с другими клиническими показателями в перечень входных параметров диагностической модели. В исследовании [122] при сравнении результатов анализа выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких, раком молочной железы, ХОБЛ и здоровыми людьми с применением «электронного носа» Cyranose 320 удалось правильно классифицировать группы со 100%-ной точностью.

В сравнительно небольшом количестве исследований принимают во внимание другие заболевания, которые также могут влиять на состав выдыхаемого воздуха, тем не менее в последние годы наблюдается значительный рост числа публикаций, где в качестве группы сравнения используют не здоровых людей, а пациентов с другими легочными заболеваниями, что в будущем может позволить выявить биомаркеры, обеспечивающие меньшее количество ложноположительных результатов. При этом немаловажными факторами являются не только селективность найденных биомаркеров по отношению к легочным заболеваниям, но и отсутствие влияния сопутствующих заболеваний, таких как сахарный диабет или хроническая сердечная недостаточность, которые распространены среди пожилых людей.

#### 1.4.5 Другие факторы, влияющие на профиль летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе

На профиль ЛОС в выдыхаемом воздухе могут влиять различные факторы, которые необходимо принимать во внимание при постановке задачи выявления биомаркеров рака легких. К подобным факторам относятся наличие статуса курения, режим питания, влияние окружающей среды, возраст и др.

Курение является одной из основных причин возникновения рака легких, которая значительно изменяет состав выдыхаемого воздуха. Многие из пациентов с раком легких – активные или бывшие курильщики, вследствие чего при сопоставлении профилей ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых людей компоненты, появляющиеся в выдыхаемом воздухе вследствие курения, могут быть ошибочно интерпретированы как биомаркеры рака легких. В некоторых работах исследовали профили выдыхаемого воздуха курильщиков и некурящих среди здоровых людей [151, 152]. В [153] сопоставляли профили ЛОС в выдыхаемом воздухе активных и пассивных курильщиков и здоровых людей. Ацетонитрил, фуран, 3-метилфуран, 2,5-диметилфуран, 2-бутанон, октан и декан присутствовали только в пробах активных и пассивных курильщиков. В работе [154] выявлено более 80 ЛОС (преимущественно диены, алкены и алкины), содержание которых зависит от курения. На основании обследования 122 человек показано, что профиль ЛОС в выдыхаемом воздухе зависит не только от наличия статуса курения, но от стажа курения. Наличие в выдыхаемом воздухе 2,5-диметилфурана и 1,3,5-гексатриена свидетельствует о наличии статуса курения. Выявлены положительные корреляции уровней концентраций 2,4-диметил-1-гептена, бутилацетата, 2,3-диметилгептана и 4-метилоктана со стажем курения [155]. Повышенное содержание фурана, толуола и 2-бутанона у курильщиков отмечают в работе [156].

Изменения концентраций ЛОС в зависимости от режима питания рассматривают с нескольких сторон: в зависимости от диеты или относительно индекса массы тела. В исследовании [157] отмечается, что с повышением индекса

массы тела возрастают концентрации 2-гексанона, *o*-, *m*-, *p*-ксилолов, 7-метил-3-метилен-1,6-октадиена, 2-ацетилпиролла, фенилацетата в выдыхаемом воздухе и убывают концентрации диметилсульфида, 3-формилтиофена, 1,2,4-триметилбензола, 3-пиридинметанола, 1-метокси-4-(1-пропенил)бензола. В работе [158] рассматривали изменения концентрации ацетона в зависимости от диеты. Показано, что при употреблении богатой жиром пищи концентрация ацетона возрастает в пять раз в течение 6 ч после употребления пищи, а низкоуглеводная диета сопровождается повышением концентрации ацетона в 6–9 раз во время диеты. В работе [159] отмечают изменения концентраций ацетона и аммиака в течение времени после последнего употребления пищи, а также кратковременное повышение концентрации этанола, что авторы связывают с наличием этанола в пище. Концентрация ацетона увеличивается также при голодании [40]. В исследовании [160] рассматривали изменения ЛОС после употребления в пищу продуктов, богатых клетчаткой. Выявлено, что концентрации этанола, 2-пропанола, ацетоина повышались, в то время как концентрации ацетона, бутанола, диацетила и фенола уменьшались.

Изменения профиля ЛОС с возрастом связывают с кумулятивным окислительным разрушением полиненасыщенных жирных кислот, белков и ДНК, вызванным активными формами кислорода, в результате которого в выдыхаемом воздухе могут появляться алканы и монометилалканы [161]. В исследовании [162] анализ альвеолярного воздуха 102 человек разных возрастов показал, что концентрации некоторых предельных углеводородов, начиная от гексана и заканчивая ундеканом, и их метилированных производных повышаются с возрастом. В работе [157] при анализе выдыхаемого воздуха представительной группы людей (1417 человек) отмечено, что с возрастом наблюдается повышение концентраций диметилсульфида, 1,2,4-триметилциклогексана, 1-метокси-4-(2-пропенил)бензола и понижение концентраций изопрена, пиридина, 2-метил-5-изопрофенил-2-циклогексен-1-она и додеканаля. В исследованиях [163, 164] выявлено, что концентрации изопрена и других ЛОС изменяются с возрастом.

При исследовании влияния гендерной принадлежности на состав ЛОС в выдыхаемом воздухе [157] отмечены повышенные концентрации пиридина и толуола у мужчин и повышенные концентрации дисульфида углерода, 2,3-диметил-4-пентенола у женщин. В работе [163] наблюдали повышенные концентрации изопрена у мужчин, однако теоретического обоснования причин этого явления пока нет.

Исследователи, занимающиеся разработкой способа диагностики рака легких по выдыхаемому воздуху, по-разному учитывают влияние перечисленных выше факторов. Из таблиц 3–6 видно, что информация о возрасте участников исследования в основном представлена медианами, однако в некоторых исследованиях обозначены лишь возрастные диапазоны. Можно заметить, что в доминирующем количестве исследований возрастная категория пациентов с раком легких и здоровых людей была одинакова и разница в медианных значениях возрастов среди публикаций не превышала 10 лет. Однако имеются публикации, где здоровые добровольцы значительно моложе, чем пациенты с раком легких. С одной стороны, значительные вариации в возрастных группах могут привести к ошибочным данным, а с другой, – на сегодняшний день увеличивается заболеваемость раком среди молодых людей, что также необходимо учитывать. Влияние возраста на изменения профиля ЛОС в выдыхаемом воздухе изучено недостаточно хорошо для того, чтобы четко идентифицировать перечень компонентов, чувствительных к возрасту, поэтому, для исключения потенциальных ошибок оптимальным вариантом является исследование больных и здоровых людей одинакового возраста.

Для учета влияния курения некоторые исследователи выделяют курильщиков в отдельную группу при создании классификационных моделей [48, 49, 51, 82, 132]. Другие исследователи исключают курильщиков из исследования и рассматривают только некурящих людей или бывших курильщиков, которые не курили минимум год [56, 91]. В исследовании [124] проблему учета влияния курения решили следующим образом: строили две диагностические модели – для больных и здоровых курильщиков и для больных и здоровых некурящих людей. В

работе [129] диагностическую модель проверяли на курильщиках и на некурящих людях; показано, что статус курения не отражается на производительности модели. В большинстве других работ влияние курения учитывают за счет установления определенного периода времени, которое должно пройти после последнего курения. Этот период в различных исследованиях устанавливают по-разному: например, в работах [69, 70, 76] перед отбором проб курильщики не курили минимум 12 ч либо ночь перед отбором проб [68], в других исследованиях время после последнего курения ограничивалось 2 [120] или 1 ч [49, 88, 117]. Имеются также работы, в которых условия отбора проб относительно курения не описаны [47, 53, 65, 71, 73, 165].

Учет влияния употребления пищи в основном ограничивается установлением периода времени, которое должно пройти после последнего приема пищи. Некоторые исследователи ограничивают время после употребления пищи 1–2 ч [55, 91, 117, 120], в других источниках условия не описаны [48, 49, 51], однако в основном пробы отбирают натощак [56, 68, 69, 70, 76, 82, 101], что является предпочтительным как с точки зрения качества анализа, так и с позиции простоты введения такого режима в клиническую практику (отбор проб для многих лабораторных исследований проводят натощак).

Наиболее надежным способом учета влияния экзогенных компонентов, попадающих в пробу из окружающего воздуха, является параллельный отбор пробы окружающего воздуха, что и осуществляли в ряде работ [55, 69, 101, 132]. Некоторые исследователи отбирали одну пробу окружающего воздуха в день отбора проб [88]. В других публикациях указано количество проб окружающего воздуха, отобранных за все время исследования [49, 56]. В большинстве работ указывается факт отбора проб окружающего воздуха, однако периодичность его отбора не представлена [51, 73, 82, 120, 135]. Вариативность учета влияния окружающего воздуха не ограничивается только периодичностью отбора проб окружающего воздуха; по-разному также осуществляют вычитание фоновых содержаний компонентов. Например, в работе [53] учитывали только те компоненты, содержания которых были на 10% больше, чем в окружающем

воздухе, в исследовании [132] – на 15%, однако в большинстве работ, учитывают те компоненты, содержание которых в образце выдыхаемого воздуха было выше, чем в пробе окружающего воздуха.

### 1.5 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования

Анализируя имеющиеся на сегодняшний день результаты исследований по данной тематике [166], можно сформулировать основные проблемы, препятствующие разработке способа диагностики, достаточно надежного для внедрения в клиническую практику:

1. Недостаточно исчерпывающие знания о метаболических путях появления ЛОС в выдыхаемом воздухе, это не позволяет однозначно относить те или иные ЛОС, обнаруженные в выдыхаемом воздухе, к биомаркерам рака легких.

2. Вариативность условий подготовки проб и анализа, в большинстве случаев не позволяющая сопоставлять результаты, полученные различными исследовательскими группами.

3. Существенная вариативность исследуемых групп добровольцев в разных исследованиях с точки зрения объема выборки и относительно факторов, которые могут влиять на состав выдыхаемого воздуха:

а) гистологический тип, стадия заболевания и статус лечения в группе пациентов с раком легких;

б) возраст, пол, статус курения добровольцев;

в) вариативность условий отбора проб: время после последнего курения и после последнего употребления пищи, время пребывания в помещении, где проводится отбор проб.

4. Вариативность учета влияния окружающего воздуха либо отсутствие данного пункта в большинстве исследований.

Исходя из вышеизложенного, нами сформулирована **цель диссертационного исследования** – создание неинвазивного способа диагностики рака легких по компонентному составу выдыхаемого человеком воздуха методами

хроматомасс-спектрометрии на основе выявленного перечня наиболее информативных для заболевания биомаркеров.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

- оптимизация условий отбора проб выдыхаемого воздуха, концентрирования и детектирования аналитов (ЛОС) аналитическими методами;
- изучение аналитических характеристик «электронного носа» на основе пьезосенсоров, хроматографического разделения и детектирования по отношению к компонентам выдыхаемого воздуха;
- выявление потенциальных биомаркеров рака легких по результатам анализа выдыхаемого воздуха различными аналитическими методами;
- влияние статуса курения, гендерной принадлежности, гистологического типа, локализации и резекции опухоли на состав выдыхаемого воздуха;
- оптимизация условий концентрирования выделяемых опухолевой тканью ЛОС, сопоставление различных профилей, характерных для выдыхаемого воздуха;
- построение диагностических моделей различными методами машинного обучения.

## 2 Экспериментальная часть

### 2.1 Материалы, реактивы и использованное оборудование

Для выполнения экспериментальных исследований использовали следующие средства измерений, устройства, реактивы и материалы:

- газовый хроматограф Хроматэк-Кристалл 5000.2 с пламенно ионизационным детектором «Хроматэк», Россия;
- газовый хроматограф Хроматэк-Кристалл 5000.2 с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Хроматэк МСД с электронным источником ионизации, «Хроматэк», Россия;
- двухстадийный термодесорбер ТДС-1, «Хроматэк», Россия;
- аспиратор Хроматэк ПВ-2, «Хроматэк», Россия;
- «электронный нос» "MCWbioG – 8" ООО «Сенсорика - новые технологии», Россия;
- пробоотборный пакет из лавсана ПП-1-5,0 ООО НПФ «ЭКАН», Россия;
- пробоотборный пакет из пленки Tedlar®, «Supelco», США;
- трубка сорбционная комбинированная (Тенакс GR, Карбопак В, Карбосив SIII) «Хроматэк», Россия;
- трубка сорбционная Chromosorb 106 «Хроматэк», Россия;
- трубка сорбционная Тенакс ТА «Хроматэк», Россия;
- трубка сорбционная Porapak N «Хроматэк», Россия;
- газохроматографическая колонка Agilent HP-FFAP (50 м × 0.32 мм, 0.5 мкм), «Agilent Technologies», США;
- газохроматографическая колонка SGE CR-5 (30 м × 0.32 мм, 1.0 мкм), «SGE Analytical Science», США;
- газохроматографическая колонка SGE Equility 1701 (30 м × 0.32 мм, 0.25 мкм), «SGE Analytical Science», США;
- газохроматографическая колонка Bruker CP-Porabond-Q (50 м × 0.32 мм, 0.45 мкм), «Thermo Scientific», США;

- газохроматографическая колонка Supelco Supel-Q PLOT (30 м × 0.32 мм), «Supelco», США;
- шприц для газовой хроматографии 10 мкл; «SGE Analytical Science», США;
- колбы мерные 2-500-2, 2-750-2, 2-1000-2, ГОСТ 1770-74;
- стеклянные флаконы 50 мл; «Simax», Чехия;
- холодильник для изотермических биологических образцов «Термо-Конт МК», Россия;
- пробки силиконовые, размеры в соответствии с ГОСТ 8682-93;
- сушильный шкаф «Mettmert», Германия;
- этанол перегнанный, ГОСТ 18300-72;
- ацетонитрил LC-MS grade, «Biosolve», Израиль;
- гексан «ч.д.а.» по ТУ 6-09-3375-78;
- ацетон «х.ч.» по ГОСТ 2603-79;
- спирт изопропиловый по ГОСТ 9805-84;
- бензол по ГОСТ 5955-75;
- толуол по ГОСТ 5789-78;
- этилацетат (> 99,9%), по ТУ COMP 3-036-06;
- диэтиловый эфир (> 95%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- октан (> 99%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- нонан (> 99%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- декан (> 99%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- ундекан (> 99%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- додекан (> 99%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- изопрен (> 95%) «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- 1,4-пентадиен (> 95%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- бутаналь (> 95%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- пентаналь (> 95%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США;
- 1-пентанол (> 95%), «Sigma-Aldrich», Sigma, США.

## 2.2 Участники исследования

Исследования с участием добровольцев проводили в 3 этапа. На первом этапе пробы, взятые у 75 здоровых людей и 75 пациентов с раком легких, анализировали методом ГХ-ПВД. Часть проб из данной выборки (по 20 человек в каждой группе) параллельно анализировали методом ГХ-МС для идентификации основных компонентов ЛОС выдыхаемого воздуха, характерных для пациентов с раком легких и здоровых людей.

На 2 этапе образцы выдыхаемого воздуха 40 других здоровых добровольцев и 40 других пациентов с раком легких параллельно анализировали двумя способами: ГХ-МС и «электронным носом». На массиве данных 2 этапа дополнительно проводили оценку влияния некоторых факторов на состав проб выдыхаемого воздуха.

Далее (3 этап) массив данных 2 этапа, полученного с применением ГХ-МС, был расширен до 112 пациентов с раком легких и 120 здоровых людей, на основании которого была построена диагностическая модель. Данные 3 этапа были проанализированы не только с точки зрения «норма-патология»; дополнительно исследовали вариативность проб пациентов с раком легких в зависимости от гистологического типа и локализации опухоли. Информация об участниках исследования представлена в таблице 7.

Все пациенты во время отбора проб находились на консультации либо на лечении в научно-исследовательском институте – краевой клинической больнице (НИИ ККБ) №1 им. С.В. Очаповского (Краснодар). Пробы здоровых добровольцев отбирали в помещении без растворителей. От всех добровольцев были получены демографические данные, включая пол, возраст, статус курения и время после последнего курения. На первом этапе пробы отбирали минимум через час после еды и минимум через 2.5 часа после курения. Для минимизации влияния посторонних факторов, на дальнейших этапах пробы отбирали натощак. Перед отбором проб добровольцы находились в помещении для отбора проб в спокойном состоянии минимум 10 мин. Затем участникам предлагали наполнить

пробоотборный пакет. Добровольцы делали несколько глубоких вдохов и выдохов с небольшим интервалом (для обеспечения полноты обновления альвеолярного воздуха), после чего совершали глубокий вдох, задерживали воздух на 10 с и совершали глубокий выдох в пакет для отбора проб, повторяя процедуру до заполнения пакета. Параллельно в этом же помещении отбирали пробу окружающего воздуха для учета влияния экзогенных компонентов.

Для сравнения до и послеоперационных профилей летучих органических соединений в образцах выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и доброкачественными опухолями, в эксперименте участвовали 12 пациентов, которым в результате осмотра торакальным хирургом была назначена операция по удалению опухоли, характер которой был известен только по результатам гистологического исследования операционного материала, в соответствии с которым установлено, что среди пациентов, задействованных в эксперименте, у 7 – рак легких, а у 5 – доброкачественная опухоль (3 пациента – фибромартозная гамартома, 2 пациента – хондромартозная гамартома). Пробы до операции отбирали перед поступлением пациента в хирургическое отделение НИИ ККБ № 1 им. С.В. Очаповского (Краснодар) на операцию. Пробы «после операции» отбирали перед выпиской пациента, то есть в диапазоне 5-10 дней после операции. Пробы отбирали с утра натощак.

Для исследования профилей ЛОС, выделяемых опухолевой тканью, 17 образцов опухолевой ткани и 1 образец здоровой ткани, отобранной вокруг образца опухолевой ткани, были предоставлены НИИ ККБ № 1 им. С.В. Очаповского, г. Краснодар. от 17 пациентов с раком легких (у 1 пациента была саркома с низкодифференцированными клетками, у 1 пациента – аденокарцинома с метастазами в легкое, у остальных 15 пациентов – аденокарцинома). Масса образцов опухолевых тканей варьировалась в диапазоне 0.1–8.8 г, масса образца здоровой ткани вокруг опухоли составляла 10.0 г. Образцы отбирали в стеклянные флаконы объемом 50 мл (Simax, Чехия) сразу после резекции и доставляли в лабораторию в медицинском холодильнике для изотермических биологических

образцов (Термо-Конт МК, Россия). Гистологический тип опухоли был определен в результате гистологического исследования.

Информированное согласие было получено от всех участников исследования. Клиническое исследование было одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 122 заседания Локального этического комитета НИИ ККБ им. проф. Очаповского министерства здравоохранения Краснодарского края от 19.12.2019 года) и проводилось с соблюдением соответствующих инструкций и регламентов.

Таблица 7 – Информация об участниках исследования

Группа	Характеристика	Этап исследования									
		1			2			3			
		Все	М	Ж	Все	М	Ж	Все	М	Ж	
Здоровые	Количество	75	22	53	40	14	26	120	36	84	
	Возраст, диапазон	18-71	18-69	18-71	23-67	18-56	23-67	21-67	21-61	21-67	
	Возраст, медиана	23	23	23	25	24	25	21	21	23	
	Количество курильщиков	12	9	3	7	2	5	17	10	6	
Пациенты с раком легких	Количество	75	54	21	40	28	12	112	88	24	
	Возраст, диапазон	30-74	30-72	34-74	38-69	38-69	41-69	21-77	21-77	24-73	
	Возраст, медиана	56	56	57	59	59	57	63	60	65	
	Количество курильщиков	25	25	0	7	5	2	22	21	1	
	Гистологический тип										
	Аденокарцинома	17	8	9	25	15	10	50	29	21	
	Плоскоклеточный рак легких	13	9	4	9	8	1	38	33	5	
	Мелкоклеточный рак легких	10	5	5	0	0	0	12	12	0	
	Немелкоклеточный рак легких	33	30	3	6	5	1	3	3	0	
	Мезотелиома плевры	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	Саркома низкодифференцированная	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	Тимома	0	0	0	0	0	0	2	2	0	
	Нейроэндокринная карцинома	0	0	0	0	0	0	2	2	0	
	Карцинома	0	0	0	0	0	0	5	4	1	
	Локализация опухоли										
	Центральная	-	-	-	-	-	-	-	58	49	9
	Периферическая	-	-	-	-	-	-	-	52	36	16
Средостение	-	-	-	-	-	-	-	2	2	0	

### 2.3 Оптимизация условий газохроматографического определения ЛОС в выдыхаемом воздухе

Для решения задачи диагностики рака легких с использованием выдыхаемого воздуха применяют различные аналитические методы, однако наиболее эффективным и информативным методом для идентификации потенциальных маркеров остается газовая хроматомасс-спектрометрия (ГХ-МС). При использовании методов газовой хроматографии и ГХ-МС применяют хроматографические колонки с различными неподвижными фазами. Учитывая относительно невысокие концентрации эндогенных соединений в выдыхаемом воздухе, широкое распространение и применение при решении подобных задач получили методы предварительного концентрирования проб с использованием сорбционных трубок с различными типами сорбентов или волокон для твердофазной микроэкстракции с последующей термодесорбцией, однако, наиболее надежным является концентрирование ЛОС с использованием сорбционных трубок, что обеспечивает количественное извлечение аналитов из фиксированного объема пробы.

Учитывая разнообразие летучих органических соединений, входящих в состав выдыхаемого воздуха, провести их одновременное определение за один аналитический цикл весьма проблематично, поэтому необходимо выделить вещества-кандидаты, которые могут быть потенциальными маркерами рака легких. Проведенный анализ литературных данных (таблица 4) показал, что в ряде исследований присутствуют некоторые повторяющиеся вещества-кандидаты (рисунок 1), поэтому в дальнейших исследованиях уделялось особое внимание данным компонентам.

В условиях отсутствия единого подхода к вопросу разработки методик ранней диагностики рака легких по выдыхаемому воздуху [167, 168], возникает необходимость оптимизации условий отбора, концентрирования и разделения определяемых веществ путем сопоставления хроматографических профилей выдыхаемого человеком воздуха.

Метод ГХ-МС представляется наиболее информативным для идентификации биомаркеров в выдыхаемом воздухе, однако, с точки зрения первичной оптимизации методики разделения целесообразным представлялось применение метода газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием (ГХ-ПИД) ввиду его достаточной чувствительности по отношению к основным компонентам, присутствующим в пробах.

### 2.3.1 Выбор оптимальной газохроматографической колонки для разделения ЛОС из выдыхаемого воздуха

Одной из наиболее важных задач в ходе проведения исследований, являлось изучение эффективности и селективности применяемых газохроматографических колонок по отношению к компонентам, присутствующим в выдыхаемом воздухе. Однако, учитывая широкий перечень веществ, выбрать одну колонку, обеспечивающую максимальную эффективность по отношению ко всем компонентам, не представляется возможным. Поэтому было принято решение сконцентрироваться на наиболее легких компонентах, поскольку более тяжелые компоненты, которые, исходя из литературных данных, присутствуют в выдыхаемом воздухе, будут также склонны к растворению в конденсате, образующемуся в пробоотборном пакете, тем самым, существенно снижая воспроизводимость результатов.

Очертив перечень потенциальных веществ-кандидатов, было принято решение изучить селективность колонок Equility TM 1701, CR5, HP-FFAP, и CP-Porabond-Q по отношению к ЛОС, входящим в состав выдыхаемого воздуха. В данном случае воздух объемом 5 л с помощью аспиратора перекачивали через сорбционную трубку с сорбентом тенакс ТА со скоростью 200 мл/мин.

Концентрированные пробы анализировали с применением ГХ-ПИД на приборе Хроматэк-Кристалл 5000.2 с пламенно ионизационным детектором. Температура инжектора составляла 250 °С, температура детектора 250 °С, газ-

носитель – азот, деление потока – 1 : 17. Режим работы термодесорбера представлен в таблице 8.

Таблица 8 – Режим работы термодесорбера

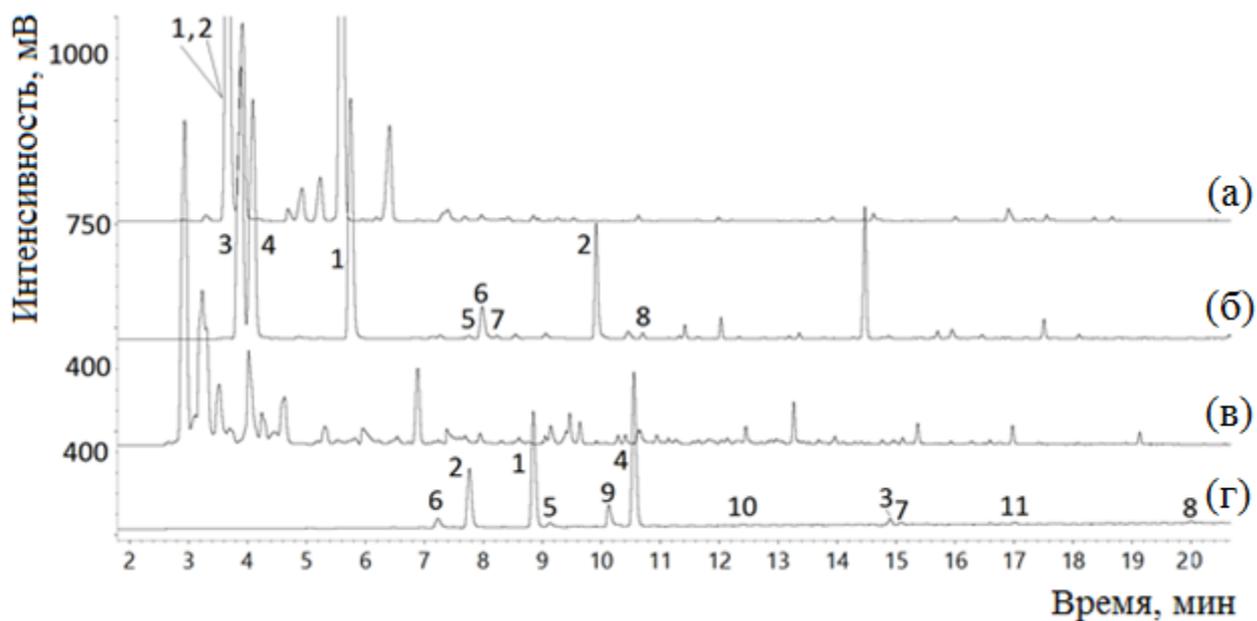
Параметр		Значение
Температура крана, °С		150
Температура переходной линии, °С		180
Температура десорбции, °С	Тенакс ТА	250
	Комбинированный	250
	Chromosorb 106	220
	Porapak N	150
Время десорбции, мин		5
Начальная температура ловушки, °С		-10
Конечная температура ловушки, °С		250
Время нагрева ловушки, мин		2

Предварительно оптимизированные температурные программы для исследуемых газохроматографических колонок представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Оптимизированные условия газохроматографического определения исследуемых соединений на различных колонках

Скорость, °С / мин	Температура, °С	Время, мин	Скорость потока газа-носителя, мл / мин
HP-FFAP			
0	41	3	1.55
7	180	15	
CR-5 и Equility TM 1701			
0	35.0	3	1.25
7	260	0	
CP-Porabond-Q			
0	150.0	1	1.42
6	220	0	
4	270	7	

На рисунке 3 представлены ГХ-ПИД хроматограммы выдыхаемого воздуха здорового добровольца, полученные с применением различных типов колонок.



а – CR-5, б – HP FFAP, в – Equity TM 1701, г – CP-Porabond-Q

Рисунок 3 – ГХ-ПИД хроматограммы сконцентрированного в сорбционной трубке Тенакс ГА выдыхаемого воздуха здорового добровольца, полученные с использованием разных колонок (1 – ацетон, 2 – ацетонитрил, 3 – гексан, 4 – изопрен, 5 – 2-пропанол, 6 – этанол, 7 – бензол, 8 – толуол, 9 – диэтиловый эфир, 10 – 2-бутанон, 11 – пентаналь)

Колонка Equility TM 1701 является среднеполярной, позволяет разделять спирты и ароматические углеводороды, но оказалась недостаточно эффективной при разделении низкомолекулярных эндогенных соединений, представляющих в наших исследованиях наибольший интерес, вследствие чего использование этой колонки для анализа выдыхаемого воздуха нецелесообразно.

Неполярная колонка CR-5 также не обеспечивала эффективное разделение малых полярных веществ, например ацетона и ацетонитрила, которые являются одними из основных компонентов выдыхаемого воздуха, что, потенциально, может привести к потере достаточно весомой части информации.

Обратная ситуация наблюдается в случае использования колонки HP FFAP, предназначенной для эффективного разделения полярных соединений, в частности спиртов и кетонов. Однако, выдыхаемый воздух содержит ЛОС различных классов, в том числе и неполярных, таких как алканы и алкены, которые также являются эндогенными, и соответственно, представляют интерес для дальнейшего изучения.

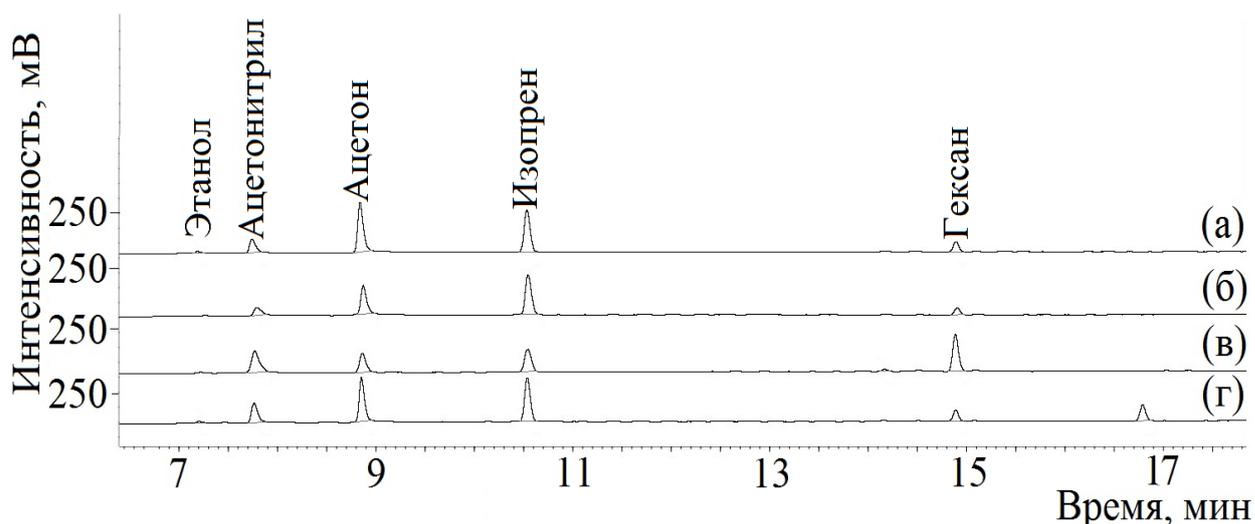
При анализе выдыхаемого воздуха с использованием этой колонки, пик в начальной части хроматограммы, время удерживания которого совпадает с временем удерживания гексана, содержит и другие неполярные соединения, вследствие чего использование этой колонки также позволит изучить состав ЛОС выдыхаемого воздуха лишь частично.

Колонка CP-Porabond-Q обеспечивает разделение легколетучих соединений, и отличается повышенными параметрами удерживания для соединений многих классов. Для анализа выдыхаемого воздуха такая колонка представляется является оптимальной, так как позволяет разделить более широкий перечень ЛОС в выдыхаемом воздухе.

### 2.3.2 Исследование эффективности различных типов сорбентов для концентрирования ЛОС из выдыхаемого воздуха

Эффективность различных типов сорбентов для концентрирования ЛОС из выдыхаемого воздуха оценивали сравнением 4 наиболее распространенных коммерчески доступных типов сорбентов: хромосорб 106, тенакс ТА, порапак N и комбинированный сорбент (тенакс GR, карбопак В, карбосив SIII). Для этого отбирали пробу объемом 5 л. По 1 л пробы воздуха со скоростью 50 мл/мин прокачивали через каждый из сорбентов, которые затем анализировали на колонке CP-Porabond-Q. Хроматограммы, полученные при концентрировании одной и той же пробы в разные сорбционные трубки представлены на рисунке 4.

Следует отметить, что ни один сорбент не обеспечил полноту извлечения всех компонентов, присутствующих в выдыхаемом воздухе. Так, этанол и ацетон лучше удерживались на сорбенте тенакс ТА, ацетонитрил и гексан – на комбинированном сорбенте, а изопрен – практически одинаково удерживается на сорбенте хромосорб 106, тенакс ТА и порапак N. Из всех сорбентов наименьшую емкость по отношению к определяемым ЛОС имел сорбент порапак N.



а – Тенакс ГА, б – порапак N, в – комбинированный, г – хромосорб 106

Рисунок 4 – ГХ-ПИД хроматограммы выдыхаемого воздуха, полученные с использованием сорбционных трубок с различными типами сорбентов

В случае применения сорбента Хромосорб 106 на хроматограммах также присутствовал системный пик, интенсивность которого практически не менялась даже после многократного кондиционирования сорбционных трубок. Тем не менее, нельзя исключать возможность наличия соединений, время удерживания которых идентично времени удерживания системного пика. Корректная оценка содержания подобных компонентов в выдыхаемом воздухе невозможна. При пропускании большего объема пробы через комбинированный сорбент наблюдали расщепление некоторых пиков и их ассиметричную форму несмотря на то, что во всех случаях использовали соответствующие ловушки в термодесорбере. В случае применения комбинированного сорбента это может быть обусловлено неравномерной десорбцией соединений из-за разных эффективных температур десорбции для сорбентов, которые использовались при упаковке трубок. Наиболее стабильные результаты достигнуты с использованием сорбента тенакс ГА, который выбрали для проведения дальнейших исследований.

### 2.2.3 Оптимизация условий концентрирования ЛОС

Оптимальный сорбируемый объем устанавливали следующим образом: к пробоотборному пакету с помощью силиконового шланга последовательно подсоединяли 2 сорбционные трубки и прокачивали различные объемы пробы со скоростью 50 мл/мин. Концентрирование без потерь для всех аналитов, за исключением этанола, достигали при пропускании 0.5 л пробы. Изучили влияние скорости пропускания пробы 50, 100 и 200 мл/мин через сорбционные трубки на эффективность концентрирования. С повышением скорости пропускания пробы не происходил проскок по определяемым компонентам. Оптимальной оказалась скорость аспирирования 200 мл/мин, которая позволила существенно ускорить процесс концентрирования ЛОС. Оптимальный сорбируемый объем и скорость пропускания пробы через сорбент составили 0.5 л пробы при скорости 200 мл/мин [169].

### 2.3.4 Изучение влияния условий хранения на дискриминацию пробы

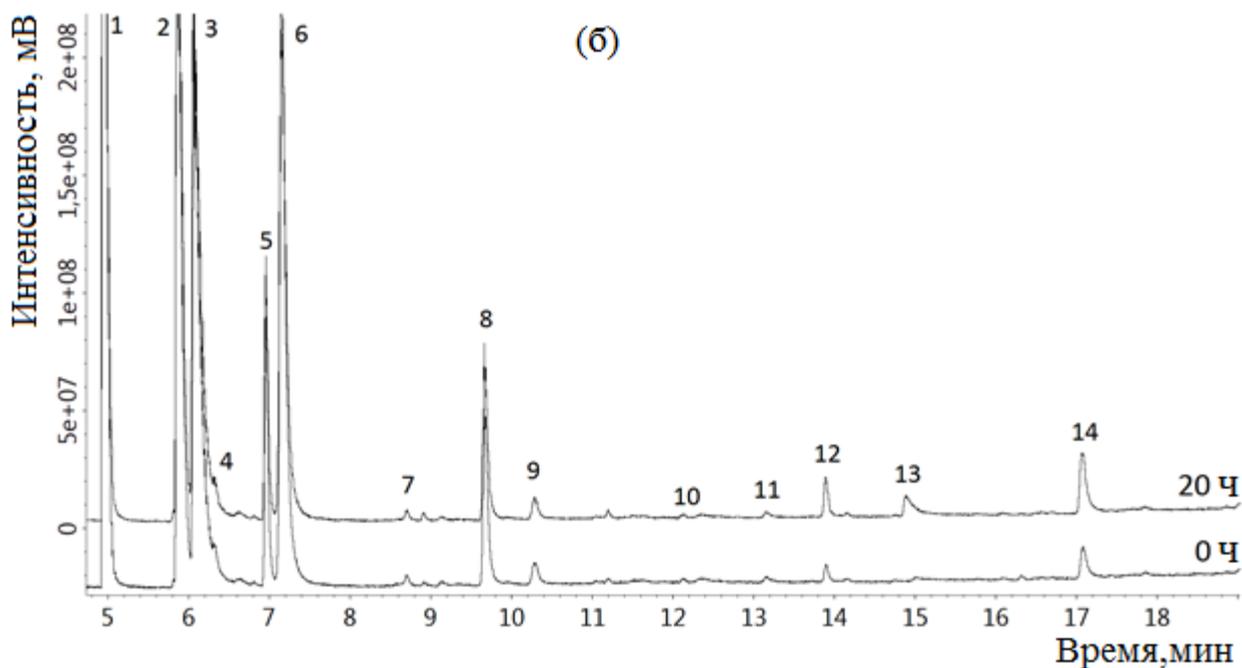
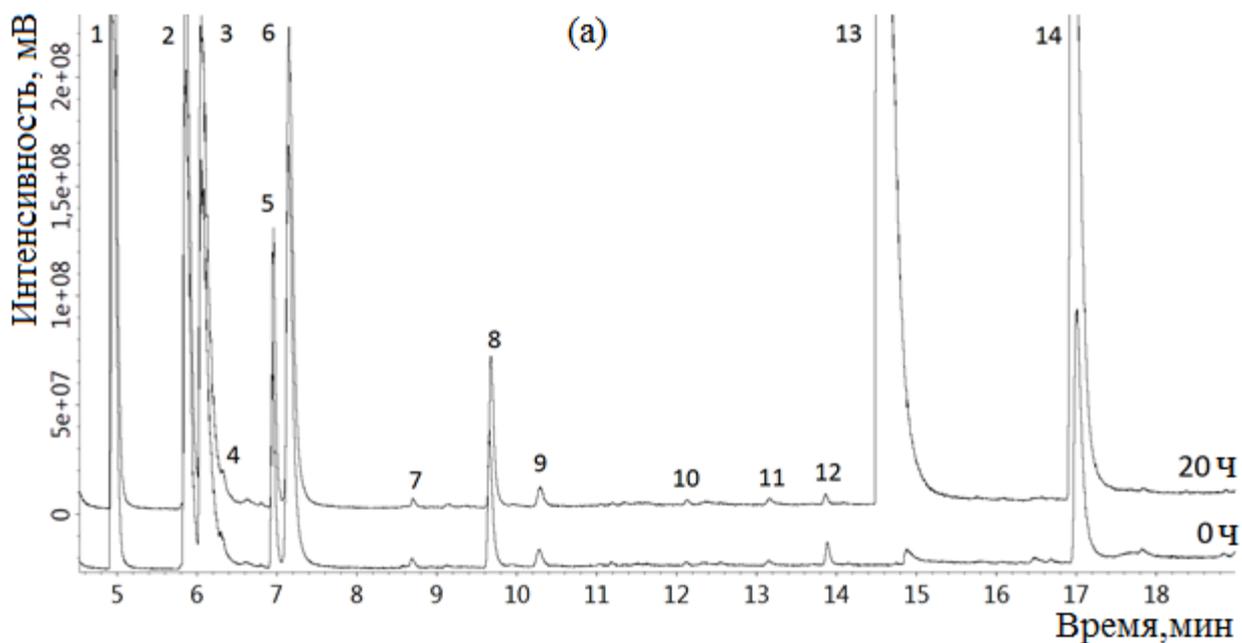
В большинстве случаев отбор проб производят в специальные пакеты для отбора проб из майлара и тедлара, однако материал пакетов может также служить источником загрязнения пробы [64–66]. Для выявления перечня компонентов, которые могут попадать в пробу из материала пакетов, провели следующий эксперимент: пакеты для отбора проб из майлара и тедлара наполняли азотом и концентрировали воздух из пакета в сорбционную трубку сразу и через 2.5 часа после заполнения. Полученные пробы анализировали методом ГХ-МС в соответствии с оптимизированными ранее условиями, а разделение осуществляли колонке Supelco Supel-Q PLOT, являющейся аналогом колонки CP-Porabond-Q. Условия анализа приведены в таблице 10.

Интенсивности фенола и N,N-диметилацетамида увеличивались в обоих типах мешков для отбора проб после 2 часов хранения, но интенсивности данных соединений были выше при использовании пакета из тедлара.

Таблица 10 – Условия ГХ-МС анализа проб выдыхаемого воздуха

Параметр	Значение			
Термодесорбер				
Газ-носитель	Гелий			
Температура крана, °С	150			
Температура переходной линии, °С	180			
Температура десорбции, °С	250			
Начальная температура ловушки, °С	–10			
Конечная температура ловушки, °С	250			
Время десорбции, мин	5			
Хроматомасс-спектрометр				
Газ-носитель	Гелий			
Температура инжектора, °С	250			
Деление потоком	1 : 10			
Температура источника ионизации, °С	200			
Температура переходной линии, °С	250			
Режим сканирования	Сканирование полного ионного тока			
Диапазон сканирования масс, Да	33–220			
Энергия ионизации, эВ	70			
Температурная программа				
Скорость нагрева, °С / мин	0	10	6	4
Температура, °С	50	150	220	250
Время, мин	0	0	7	0
Скорость потока газа-носителя, мл / мин	1.30			

Изучили влияние типа пробоотборного пакета на скорость деградации выдыхаемого воздуха с течением времени. Для этого проводили концентрирование пробы сразу после отбора проб, через 2 и 20 часов (рисунок 5). Выявили, что интенсивности пиков основных ЛОС в выдыхаемом воздухе практически не меняются во времени, но наблюдали повышение интенсивностей пиков фенола и N, N-диметилацетамида в обоих типах пробоотборных пакетов, что подтверждает появление этих соединений в образце за счет контаминации материалом пробоотборного пакета. Стоит отметить, что пакеты из майлара и тедлара способны удерживать аналиты в течение 20 часов, однако, загрязнение образца при использовании для отбора проб майларового пробоотборного пакета значительно меньше, чем из тедларового (рисунок 5).



а – мешки для отбора проб из тедлара, б – из майлара

Рисунок 5 – ГХ-МС хроматограммы по полному ионному току образцов выдыхаемого воздуха здорового добровольца, отобранного с использованием пробоотборных пакетов различных материалов через 0 и 20 часов после концентрирования (1 – ацетонитрил, 2 – ацетон, 3 – 2-пропанол, 4 – диметилсульфид, 5 – диэтиловый эфир, 6 – изопрен 7 – трихлорметан, 8 – гексан, 9 – бензол, 10 – гептан, 11 – толуол, 12 – гептаналь, 13 – N,N-диметилформамид, 14 – фенол)

## 2.4 Возможности использования «электронного носа» с пьезосенсорами для анализа выдыхаемого воздуха

Несмотря на информативность и надежность ГХ-МС существенно уступает в производительности, мобильности и простоте применения устройствам типа «электронного носа», что делает их привлекательными с точки зрения их применения в диагностических целях. Одним из наиболее распространенных типов газовых сенсоров, применяемых для анализа проб выдыхаемого воздуха, являются сенсоры на основе кварцевых микровесов, покрытые молекулярными пленками металлопорфиринов [68, 125, 126, 144].

В настоящей работе рассмотрели аналитические характеристики «электронного носа» на основе пьезокварцевых микровесов. Несомненным преимуществом данного устройства является отсутствие необходимости предварительного концентрирования образца, высокая скорость анализа пробы и простота применения. Согласно технической документации этого устройства, пьезокварцевые сенсоры покрыты пленками из углеродных нанотрубок, биогидроксиапатита, нитрата оксида циркония, полиэтиленгликоль сукцината, дициклогексана-18-краун-6, описание некоторых из них для решения различных аналитических задач представлено в работах [170–172], однако ранее данные пленки не применяли для анализа выдыхаемого воздуха.

### 2.4.1 Аналитические характеристики определения компонентов выдыхаемого воздуха с использованием «электронного носа» на основе пьезосенсоров

Оценку аналитических характеристик «электронного носа» изучали по отношению к некоторым соединениям, которые могли быть обнаружены в выдыхаемом воздухе. Поскольку выдыхаемый воздух может содержать широкий перечень компонентов, необходимо оценивать чувствительность и селективность пленочных покрытий к соединениям различных классов, таких, как предельные углеводороды (гексан), спирты (C1-C5), кетоны (ацетон, метилэтилкетон), простые

эфир (диэтиловый эфир), сложные эфиры (этилацетат, бутилацетат), ароматические соединения (бензол, толуол), кислоты (муравьиная, уксусная), амины (метиламин, третбутиламин, этилендиамин, бензиламин), вода, аммиак, ацетонитрил.

«Электронный нос» «МСWbioG – 8» (Многоканальные нановесы биогазов, ООО "Сенсорика - новые технологии", Воронеж), представляет собой цилиндрическую ячейку с патрубком для ввода воздушных проб. Измерения проводили с использованием 8 сенсоров, покрытых пленочными сорбентами: углеродные нанотрубки 1 (УНТ1), нитрат оксида циркония 1 (Zr1), дициклогексан-18-краун-6 (ДЦГ18К), биогидроксиапатит 1 (ГА1), биогидроксиапатит 2 (ГА2), нитрат оксида циркония 2 (Zr2), полиэтиленгликоль сукцинат (ПЭГСк), углеродные нанотрубки 1 (УНТ2). Для пьезокварцевых сенсоров в случае с УНТ1, Zr1, ДЦГ18К6, ГА1 и ПЭГСк собственная частота колебаний  $F_0$  составляла 10 МГц, для остальных – 14 МГц.

Из аналитических характеристик «электронного носа» рассматривали несколько параметров: аналитический сигнал ( $\Delta F_{\max, i}$ , Гц) рассчитывали как разность между исходной частотой колебаний ( $F_0$ ) и максимальным отклонением от исходной частоты колебаний сенсора за время анализа; площадь «визуального отпечатка», ( $S_{в.о.}$ , Гц с), представляющая собой матрицу  $\Delta F_{\max}$  нескольких сенсоров; параметр относительной чувствительности сенсоров к аналиту, представляющий собой отношение максимальных сигналов двух сенсоров к выбранным соединениям ( $A_{ij \max}$ ):

$$A_{ij \max} = \Delta F_{\max i} / \Delta F_{\max j},$$

где  $\Delta F_{\max, i(j)}$  – максимальный аналитический сигнал  $i$  ( $j$ )-того сенсора в массиве, Гц [173].

Первым этапом исследования было получение отклика «электронного носа» на индивидуальные соединения. Для этого 2 мкл аналита вносили в чашку Петри, после чего помещали «электронный нос» над тест-веществом на 80 с, после чего проводили последующую десорбцию в течение 120 с. Для каждого из соединений рассчитывали идентификационные параметры  $A_{ij}$  и выбирали наиболее

информативные диапазоны значений для каждого из параметров (таблица 11). Наиболее интенсивные отклики сенсоров были характерны для аминов и карбоновых кислот. Из таблицы 11 видно, что параметр  $A_{ij}$  в большинстве случаев одинаков для нескольких соединений, вследствие чего идентификация компонентов с применением данного устройства затруднена. Тем не менее, соединения одного класса зачастую попадают в один диапазон значений параметра  $A_{ij}$ , что может быть использовано для группового анализа присутствующих в образцах компонентов.

Ранее отмечалось [172], что некоторые соединения могут агрессивно воздействовать на пленки и могут привести к изменению чувствительности пленок, отсутствию воспроизводимости и сдвигу  $F_0$ . После сорбции паров таких соединений, как бензиламин и этилендиамин, наблюдали отсутствие десорбции аналитов с пленок, что повлекло за собой изменение  $F_0$ , а также свойств пленок-модификаторов по отношению к большинству соединений. Идентификационные параметры пересчитывали для всех аналитов после воздействия аминов (таблица 11). Для предотвращения дальнейших изменений свойств пленок, вследствие воздействия агрессивных компонентов, определение аминов и карбоновых кислот не проводили.

Таблица 11 – Идентификационные параметры «электронного носа»

Идентификационный параметр	Значение (до анализа аминов)	Значение (после анализа аминов)	Соединение
$A_{УНТ1/ Zr1}$	0.20±0.02	0.20±0.02	Метиламин, этилендиамин, аммиак
	0.34±0.03	0.34±0.03	Вода, бензиламин, третбутиламин
$A_{УНТ1/ Zr1}$	0.18-0.33		Метанол, этанол, 2-пропанол, 1-бутанол, 2-бутанол, изоамиловый спирт, ацетон, муравьиная кислота, уксусная кислота
		0.4±0.1	Этанол, метанол, муравьиная кислота, уксусная кислота

Продолжение таблицы 11

Идентификационный параметр	Значение (до анализа аминов)	Значение (после анализа аминов)	Соединение
A <sub>УНТ1</sub> /Zr1		0.9±0.3	Метанол, этанол, 2-пропанол, 1-бутанол, 2-бутанол, изоамиловый спирт, ацетон
	0.8±0.3	1.5±0.3	Бензол, толуол, этилацетат, бутилацетат
	1.5±0.8	3.0±1.0	Гексан
A <sub>УНТ1</sub> /ДЦ18К	0.27±0.03	0.45±0.05	Гексан
	0.34±0.04	0.34±0.04	Вода
	0.13±0.05	0.13±0.05	Толуол, этилацетат, бутилацетат, ацетон, бензиламин, аммиак
	0.11±0.04	0.26±0.02	Диэтиловый эфир
	0.04±0.03	0.04±0.03	Метанол, этанол, 2-пропанол, 1-бутанол, 2-бутанол, изоамиловый спирт, ацетонитрил, муравьиная кислота, уксусная кислота, третбутиламин
A <sub>УНТ1</sub> /ГА1	0.16±0.01	0.160±0.010	Аммиак
	0.15±0.02		Вода, метанол
	0.34±0.05		Этилендиамин
		0.34±0.05	Вода, метанол, этилендиамин
	0.20±0.05		Уксусная кислота, этанол
	0.53±0.07		Бензиламин, третбутимаин
		0.53±0.07	Уксусная, этанол, бензиламин, третбутимаин
	0.30±0.04		Муравьиная кислота, 2-пропанол
	0.50±0.15		Изоамиловый спирт
		1.0±0.3	Муравьиная кислота, 2-пропанол, 1-бутанол, 2-бутанол, изоамиловый спирт
	0.5±0.2		Этилацетат, бутилацетат, диэтиловый эфир
	0.9±0.1		Бензол, толуол
	1.2±0.1		Гексан
	>1.5	Этилацетат, бутилацетат, бензол, толуол, гексан, диэтиловый эфир	

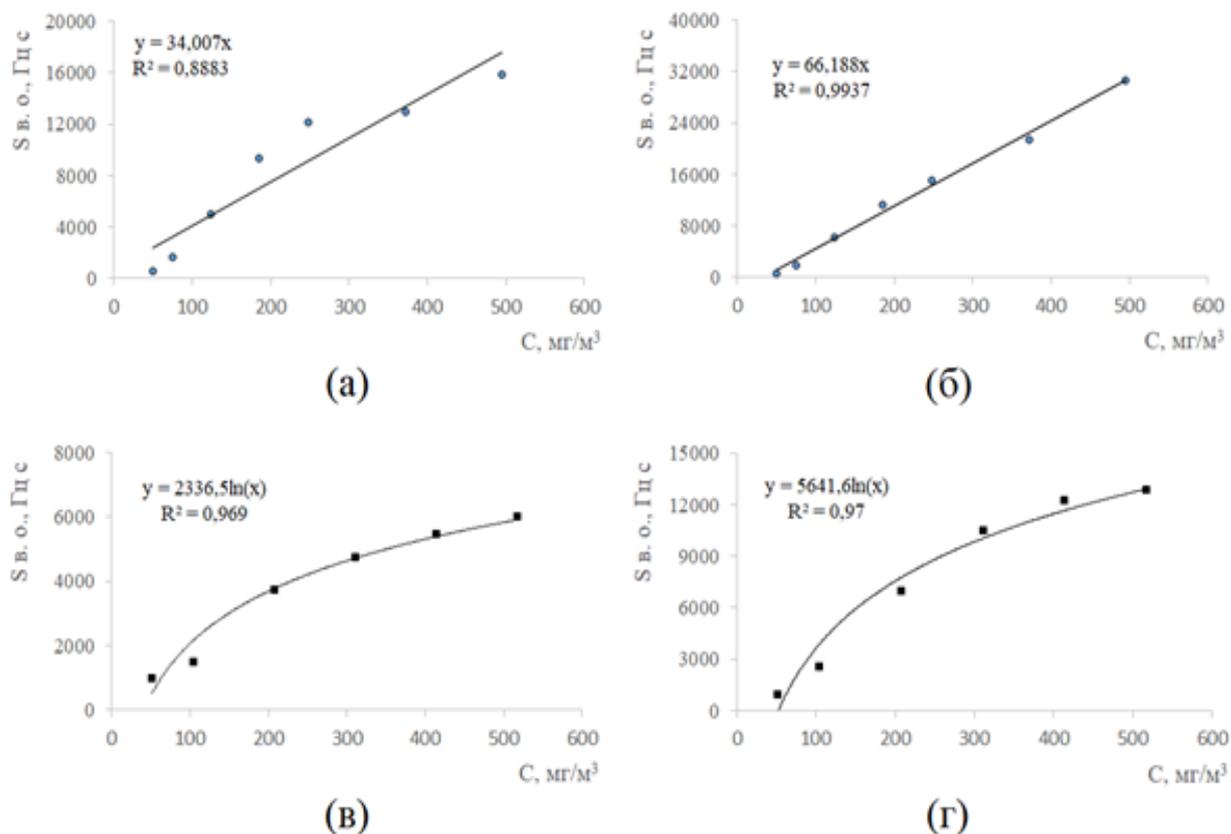
Продолжение таблицы 11

Идентификационный параметр	Значение (до анализа аминов)	Значение (после анализа аминов)	Соединение
А <sub>УНТ1/ГА2</sub>	0.8±0.2		Этилацетат, бутилацетат, диэтиловый эфир
	>1.35		Вода, бензол, толуол, гексан
		>1.35	Бензол, толуол, этилацетат, бутилацетат, гексан, диэтиловый эфир
	<1.35	<1.35	Метанол, этанол, 2-пропанол, 1-бутанол, 2-бутанол, изоамиловый спирт, муравьиная кислота, уксусная кислота, метиламин, этилендиамин, бензиламин, аммиак, третбутиламин
	0.18±0.05	0.18±0.05	Метиламин, этилендиамин, аммиак
А <sub>УНТ1/Зr2</sub>	0.47±0.05		Вода
	0.29±0.03		Метанол, бензиламин, третбутиламин
		0.29±0.03	Вода, метанол, бензиламин, третбутиламин
	0.30±0.04	0.40±0.05	Этанол, муравьиная кислота, уксусная кислота
А <sub>УНТ1/ЛЭГСК</sub>	0.14±0.09	0.14±0.09	Муравьиная кислота, уксусная кислота, метанол, этанол, ацетонитрил, бензиламин, третбутиламин
	0.11±0.02		1-бутанол, 2-бутанол, изоамиловый спирт
	0.18±0.03		Ацетон
	0.40±0.05		Вода
		0.40±0.05	Вода, ацетон, 1-бутанол, 2-бутанол, изоамиловый спирт
	0.30±0.05		Этилацетат, бутилацетат, бензол
	0.45±0.05		Толуол
		0.8±0.2	Бензол, толуол, этилацетат, бутилацетат
	1.2±0.2	2.0±0.2	Гексан

Продолжение таблицы 11

Идентификационный параметр	Значение (до анализа аминов)	Значение (после анализа аминов)	Соединение
Azr1/ГA1	0.42±0.05	1.0±0.2	Вода
	1.5±0.2	0.8±0.2	Гексан
Azr1/ГA2	5±1	5±1	Вода, аммиак
Azr1/ГA2	2.8±0.6	2.8±0.6	Этилендиамин, бензиламин, этанол, муравьиная кислота, ацетонитрил
	1.1±0.5		Бензол, этилацетат, бутилацетат, уксусная кислота
	2.0±0.3		Толуол
		1.1±0.5	Бензол, толуол, этилацетат, бутилацетат, уксусная кислота
Azr1/УНТ2	0.25±0.07	0.25±0.07	Бензол, толуол, этилацетат, бутилацетат
	0.45±0.10	0.45±0.10	Вода, изоамиловый спирт
Azr2/ПЭГСК	0.9±0.2		Бензол, толуол, бутилацетат, метиламин, этилендиамин
	0.55±0.05		Этилацетат
		0.9±0.2	Бензол, толуол, этилацетат, бутилацетат, метиламин, этилендиамин
	1.3±0.2	1.3±0.2	Вода

Затем строили градуировочные зависимости площади «визуального отпечатка» максимальных откликов сенсоров от концентрации различных индивидуальных соединений. При этом рассматривали площадь «визуального отпечатка» сигналов всех сенсоров в массиве и площадь фигуры «визуального отпечатка» сигналов 3 наиболее чувствительных к определенному соединению сенсоров (таблица 12). Диапазон концентраций для различных соединений варьировал от 12 до 900 г/м<sup>3</sup>. Градуировочные зависимости для всех соединений, за исключением гексана, имели линейный характер. Для гексана зависимость была логарифмической (рисунок 6).



весь массив сенсоров и 3 наиболее чувствительных сенсора, (а), (в) – гексан, (б), (г) – ацетон

Рисунок 6 – Зависимость площади «визуального отпечатка» (откликов сенсоров) от концентрации ацетона и гексана в растворе для полного массива сенсоров и для 3 наиболее чувствительных сенсоров

Коэффициенты детерминации градуировочных зависимостей, построенных по 3 наиболее чувствительным к определенному соединению сенсоров, оказались выше, чем в случае использования максимальных откликов всех сенсоров, либо были практически одинаковыми для всех соединений (таблица 12). Неселективные по отношению к исследуемому соединению сенсоры больше были подвержены флуктуациям, так как их сигнал близок к фоновому, что проявлялось на форме и площади «визуального отпечатка» и уменьшало значение коэффициента детерминации. Поэтому приоритетным было использование только чувствительных к определенному соединению сенсоров, что могло способствовать большей селективности анализа.

Стоит отметить, что при проведении анализов требовался достаточно жесткий контроль условий окружающей среды, в частности температуры и

влажности. При выполнении исследования проводили имитацию работы в различных условиях – температуре 20–26 °С и влажности в диапазоне 20–50%. Максимальные температурные колебания в течение дня составляли 2.5 °С, влажности – 10%. В разных условиях наблюдали значительные изменения сигнала, требующие соответствующей коррекции, которую проводили с использованием этанола. Каждый день, перед началом эксперимента, проводили калибровку по этанолу, затем, сопоставив данные за весь период эксперимента, установили изменения в откликах сенсоров на этанол в различных условиях, после чего для каждого сенсора рассчитывали поправочные коэффициенты.

Таблица 12 – Уравнения градуированных зависимостей аналитического сигнала «электронного носа» для различных соединений

Соединение	Предел детектирования аналита, г/м <sup>3</sup>	Диапазон определяемых концентраций, г/м <sup>3</sup>	Площади максимумов всех сенсоров	R <sup>2</sup>	Наиболее активные сенсоры	Площади максимумов наиболее активных сенсоров	R <sup>2</sup>
Ацетон	15	50–500	$y = 34.0x$	0.888	УНТ1, ДЦГ18К, ПЭГСк	$y = 66.2x$	0.994
Ацетонитрил	3	10–250	$y = 35.7x$	0.985	Zr1, ДЦГ18К, ПЭГСк	$y = 102.4x$	0.988
Диэтиловый эфир	35	100–900	$y = 9.1x$	0.957	ДЦГ18К, Zr2, УНТ2	$y = 15.9x$	0.965
Гексан	15	50–500	$y = 2336.25 \ln(x)$	0.948	УНТ1, ДЦГ18К, УНТ2	$y = 5641.6 \ln(x)$	0.955
Метанол	3	10–60	$y = 235.8x$	0.999	ДЦГ18К, Zr2, ПЭГСк	$y = 380.8x$	0.996
Этанол	3	10–60	$y = 171.9x$	0.938	ДЦГ18К, Zr2, ПЭГСк	$y = 273.9x$	0.945
2-Пропанол	3	10–90	$y = 42.4x$	0.971	Zr1, ДЦГ18К, ПЭГСк	$y = 133.1x$	0.985
1-Бутанол	3	10–120	$y = 49.7x$	0.993	ДЦГ18К, ПЭГСк, УНТ2	$y = 119.6x$	0.995
2-Бутанол	3	10–120	$Y = 11.389x + 1070.5$	0.899	ДЦГ18К, ПЭГСк, УНТ2	$y = 68.1x + 1705.6$	0.996
Изоамиловый спирт	3	10–120	$y = 23.972x + 1301.8$	0.976	ДЦГ18К, ПЭГСк, УНТ2	$y = 110.1x + 1357.1$	0.966
Бензол	3	10–70	$y = 136.6x$	0.958	ДЦГ18К, ПЭГСк, УНТ2	$y = 436.5x$	0.955

Продолжение таблицы 12

Соединение	Предел детектирования аналита, г/м <sup>3</sup>	Диапазон определяемых концентраций, г/м <sup>3</sup>	Площади максимумов всех сенсоров	R <sup>2</sup>	Наиболее активные сенсоры	Площади максимумов наиболее активных сенсоров	R <sup>2</sup>
Толуол	3	10–140	$y = 58.5x$	0.972	ДЦГ18К, ПЭГСк, УНТ2	$y = 185.2x$	0.985
Этилацетат	10	30–140	$y = 41.5x$	0.979	ДЦГ18К, ПЭГСк, УНТ2	$y = 124.0x$	0.992
Бутилацетат	3	10–60	$y = 86.3x$	0.999	ДЦГ18К, ПЭГСк, УНТ2	$y = 211.1x$	0.999
Вода	3	10–120	$y = 63.1x$	0.981	ГА1, Zr2, УНТ2	$y = 78.1x$	0.983

Другим немаловажным фактором являлось изучение влияния компонентного состава воздуха в помещении, поскольку при адаптации метода к применению в условиях клинической диагностики необходимо учитывать возможные влияния, связанные с применением различных моющих и дезинфицирующих средств, в частности, 2-пропанола и 1-пропанола, а также наличия иных легколетучих растворителей в помещении. Установлено, что их влияние достаточно велико и пренебречь ими во время проведения исследования не представляется возможным.

#### 2.4.2 Оптимизация условий анализа выдыхаемого воздуха с помощью «электронного носа»

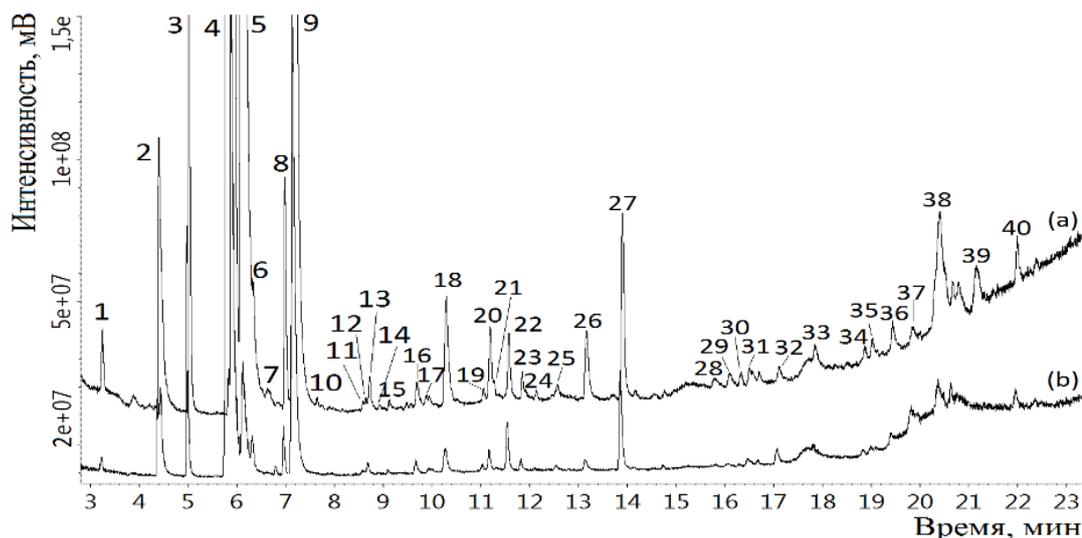
Изначально устанавливали оптимальный объем пробы, вводимый в ячейку детектирования. При этом учитывали, что введение слишком большого объема пробы может привести к изменению давления в закрытой ячейке, что скажется на регистрируемом сигнале, а при использовании малых объемов чувствительности прибора может не хватить. Исходя из этого, для рассмотрения выбрали три объема вводимой пробы выдыхаемого воздуха – 5, 10 и 15 мл.

Оценку влияния давления в системе проводили с использованием пробы отобранного в помещении с использованием медицинского шприца воздуха объемом 20 мл. Отобранную пробу вручную вводили в ячейку со скоростью 1 мл/сек. Установили, что дрейф базовой линии при введении 5 и 10 мл пробы не превышал паспортного значения для открытой системы (5 Гц), в то время, как ввод 15 мл приводил к увеличению дрейфа до 7 Гц и увеличению времени стабилизации показаний сенсоров после проведения исследования. Таким образом, установили, что оптимальным является введение 10 мл пробы выдыхаемого воздуха из пробоотборного пакета. При этом время анализа составляло 200 с, где 10 с – ввод пробы, 70 с – сорбция компонентов пробы и 120 с – десорбция [174].

## 2.5 ГХ-МС и ГХ-ПВД анализ образцов выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и здоровых людей

Для повышения информативности проводимых исследований и идентификации всех компонентов, присутствующих на хроматограмме с использованием библиотеки масс-спектров, использовали метод ГХ-МС.

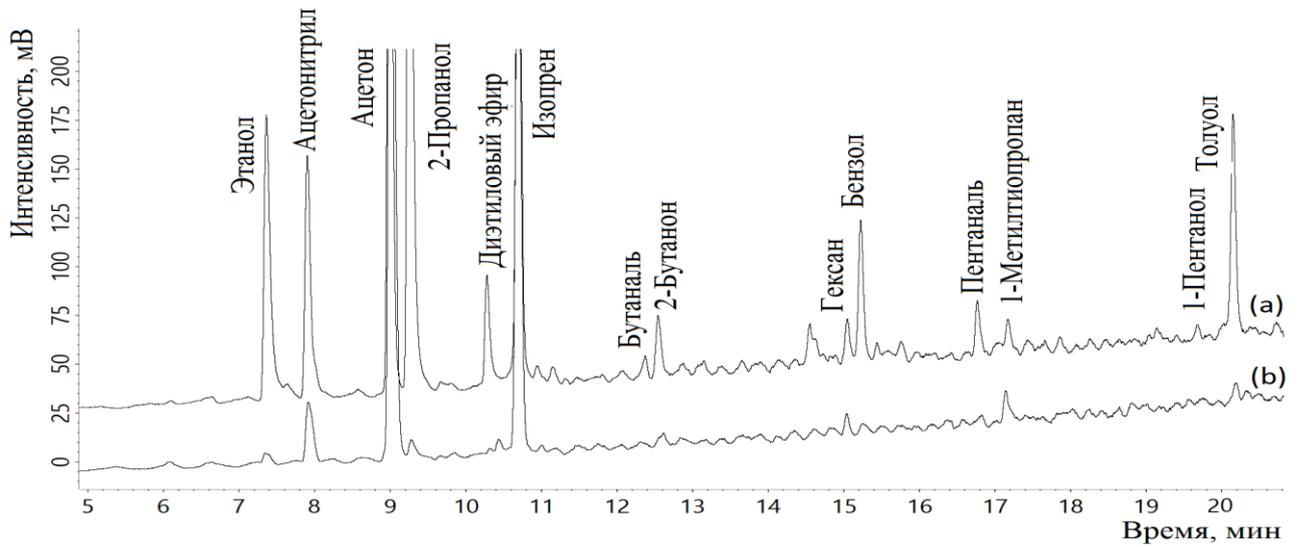
Проанализировали выдыхаемый воздух 20 больных раком легких и 20 здоровых людей из группы участников исследования (таблица 7). Идентификацию этанола, ацетонитрила, ацетона, 2-пропанола, гексана, бензола и толуола, изопрена, 1,4-пентадиена, бутанола, пентанола, диэтилового эфира, этилацетата проводили с применением стандартных веществ. Установление других веществ-кандидатов, предположительно присутствующих в пробах, проводили путем сопоставления полученных масс-спектров с библиотечными (NIST 17) и имеющимися литературными данными. Удовлетворительным признавали результат, при котором фактор подобия спектра превышал 85%. Типичные ГХ-МС хроматограммы по полному ионному току выдыхаемого воздуха больного раком легких и здорового человека представлены на рисунке 7.



а – пациент с раком легких, б – здоровый

Рисунок 7 – ГХ-МС хроматограммы выдыхаемого воздуха пациента с раком легких и здорового человека по полному ионному току; 1 – ацетальдегид, 2 – этанол, 3 – ацетонитрил, 4 – ацетон, 5 – 2-пропанол, 6 – диметилсульфид, 7 – метилацетат, 8 – диэтиловый эфир, 9 – изопрен, 10 – 1,4-пентадиен, 11 – бутаналь, 12 – 2,3-бутандион, 13 – 2-бутанон, 14 – диметилкарбонат, 15 – этилацетат, 16 – гексан, 17 – 3-метил-3-пентен-ин, 18 – бензол, 19 – 2-пентанон, 20 – пентаналь, 21 – 2,5-диметилфуран, 22 – 1-метилтиопропан, 23 – 1-метилтиопропен, 24 – гептан, 25 – 1-пентанол, 26 – толуол, 27 – гексаналь, 28 – этилбензол, 29 – м-ксилол + р-ксилол, 30 – 3-гептанон, 31 – 2-гептанон, 32 – фенол, 33 – бензальдегид, 34 – 6-метил-5-гептен-он, 35 – 1,4-дихлорбензол, 36 – октаналь, 37 – 2-этил-2-гексанол, 38 – 1,2-нонандиен, 39 – 1,1-(1,4-фенилен)бис-этанон, 40 – нонаналь

Несмотря на информативность метода ГХ-МС, оценивали возможность применения для этих целей более простого и доступного метода, например, ГХ-ПВД. Пробы 75 пациентов с раком легких и 75 здоровых людей (таблица 7) были проанализированы с применением ГХ-ПВД. Идентификацию соединений при отсутствии стандартов проводили путем сопоставления хроматограмм одной и той же пробы, полученных с использованием ГХ-МС. На рисунке 8 представлены хроматограммы больного раком легких и здорового человека, которые оказались различными. Стоит отметить большую вариативность профилей ЛОС в выдыхаемом воздухе разных людей как в группе пациентов с раком легких, так и в группе здоровых людей, вследствие чего с помощью статистических методов анализа возможным стало оценить наличие либо отсутствие значимых отличий.



а – больной раком легких, б – здоровый

Рисунок 8 – ГХ-ПИД хроматограммы выдыхаемого воздуха человека, больного раком легких и здорового человека

Наиболее часто встречающиеся ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых людей, обнаруженные с применением ГХ-МС и ГХ-ПИД, и частота их присутствия в пробах представлены в таблице 13.

Результаты ГХ-ПИД анализа анализировали статистическими методами обработки. Площадь хроматографического пика использовали в качестве количественного параметра для статистического анализа данных. Для учета влияния окружающего воздуха площадь компонента в выдыхаемом воздухе рассчитывали, как разность площадей компонента в пробе и окружающем воздухе. Отрицательные значения приравнивали к нулю.

Статистический анализ данных проводили в отношении тех соединений, которые присутствовали в более 50% случаев: изопрен, ацетон, ацетонитрил, диметилсульфид, диэтиловый эфир, бутаналь, 2-бутанон, гексан, бензол, 2-пентанон, пентаналь, 1-метилтипропан, 1-пентанол, толуол.

Таблица 13 – Частота появления ЛОС в выдыхаемом воздухе и образцах опухолевой ткани, %

Детектор	ПИД	ПИД	МСД	МСД
Соединение	Рак легких	Здоровый	Рак легких	Здоровый
Количество образцов	75	75	20	20
Ацетонитрил	100	97	100	100

## Продолжение таблицы 13

Детектор	ПВД	ПВД	МСД	МСД
Соединение	Рак легких	Здоровый	Рак легких	Здоровый
Ацетон	100	100	100	100
Изопрен	100	100	100	100
Бутаналь	55	29	70	50
2-Бутанон	68	49	95	80
Гексан	91	88	100	85
Бензол	79	43	60	30
Пентаналь	67	83	95	90
1-Пентанол	56	49	90	70
Толуол	76	53	85	50
1-Метилтиопропан	59	73	95	60
Диметилсульфид	48	53	100	100
2-Пентанон	81	67	90	90
Диэтиловый эфир	80	84	90	100
Этилацетат	39	43	30	60
Этилбензол	-	-	65	30
<i>m</i> -ксилол + <i>n</i> -ксилол	-	-	60	30
<i>o</i> -ксилол	-	-	55	60
2-Гептанон	-	-	85	85
2,3-Бутандион	-	-	90	75
Гексаналь	-	-	100	100
Диметилкарбонат	-	-	60	20
Лимонен	-	-	75	55

Полученные в ходе эксперимента данные можно обрабатывать различными способами: по площади пиков ЛОС и / или их соотношениям. В первом случае вариативность проб, обусловленная особенностями метаболизма, может быть причиной существенной рассогласованности результатов. Этот недостаток, возможно, может быть нивелирован при использовании второго подхода. Кроме того, первый подход будет сильно ограничен конкретными параметрами чувствительности хроматографической системы, в то время как использование соотношений между компонентами, позволит существенно снизить подобную вариативность. Для статистического анализа данных рассматривали как площади пиков, так и соотношения площадей пиков всех соединений к наиболее часто встречающимся из них: ацетону, ацетонитрилу и изопрену.

Нормальность распределения данных проверяли с помощью теста Колмогорова-Смирнова, который показал, что распределение полученных данных не подчиняется нормальному закону. Далее применяли метод ранговой корреляции Спирмена для выявления всех ЛОС и их соотношений со статистически значимой взаимосвязью с переменной заболевание. Статистически значимым считали результат в случае, если  $p$ -уровень был меньше 0.05. ЛОС и их соотношения, коррелирующие с заболеванием и не дублирующие друг друга, представлены в таблице 14.

Данные соединения и их соотношения использовали в качестве входных параметров для построения двух типов диагностических моделей с применением искусственных нейронных сетей (ИНС). Входные параметры одной модели представляли собой площади пиков 8 ЛОС: ацетонитрил, ацетон, бутаналь, гексан, бензол, пентаналь, толуол и 2-бутанон; другой – 8 соотношений: толуол / ацетонитрил, 1-метилтиопропан / ацетонитрил, 1-пентанол / ацетонитрил, гексан / ацетонитрил, бутаналь / изопрен, пентаналь / изопрен, 2-бутанон / изопрен и бензол / ацетон. Исходная выборка была разделена на три части: обучающая (104 образца), контрольная (20 образцов) и тестовая (26 образцов).

Таблица 14 – ЛОС и их соотношения, задействованные в построении диагностических моделей

Соединение	Коэффициент корреляции
Ацетонитрил	0.448
Изопрен	0.193
Бутаналь	0.317
Гексан	0.170
Бензол	0.346
2-Пентанон	0.274
Пентаналь	-0.255
Толуол	0.352
2-Бутанон	0.223
Соотношение	Коэффициент корреляции
Толуол/Ацетонитрил	0.240
1-Метилтиопропан /Ацетонитрил	-0.236
1-Пентанол/Ацетонитрил	-0.175

## Продолжение таблицы 14

Соотношение	Коэффициент корреляции
Гексан/Ацетонитрил	-0.272
Бутаналь/Изопрен	0.284
Пентаналь/Изопрен	-0.267
2-Бутанон/Изопрен	0.170
Бензол/Ацетон	0.367

Для построения диагностических моделей использовали нейронные сети типа многослойный персептрон с одним скрытым слоем. Протестировали 1000 различных топологий нейронных сетей для площадей пиков ЛОС, и 1000 топологий – для их соотношений, и выбрали сети с максимальной производительностью. Входными параметрами одной модели были площади пиков 8 соединений, а другой – 8 соотношений. Скрытый слой каждой нейронной сети состоял из 6 нейронов, а выходной слой содержал 2 нейрона, соответствующих статусу «норма-патология». Для обучения ИНС применяли алгоритм Бройдена - Флетчера - Голдфарба – Шанно с функцией активации сигмоида для скрытого слоя и функцией активации софтмакс для выходного слоя. Производительности построенных моделей представлены в таблице 15.

Исходя из полученных результатов, в случае площадей пиков, диагностическая модель правильно классифицировала всех больных раком легких и здоровых добровольцев на тестовых данных. Модель, построенная на соотношениях площадей пиков, ошибочно определила одного здорового добровольца как пациента с раком легких. Стоит отметить, что чувствительность, специфичность, общая точность диагностических моделей на основе площадей пиков и их соотношений были схожи и достаточно высоки.

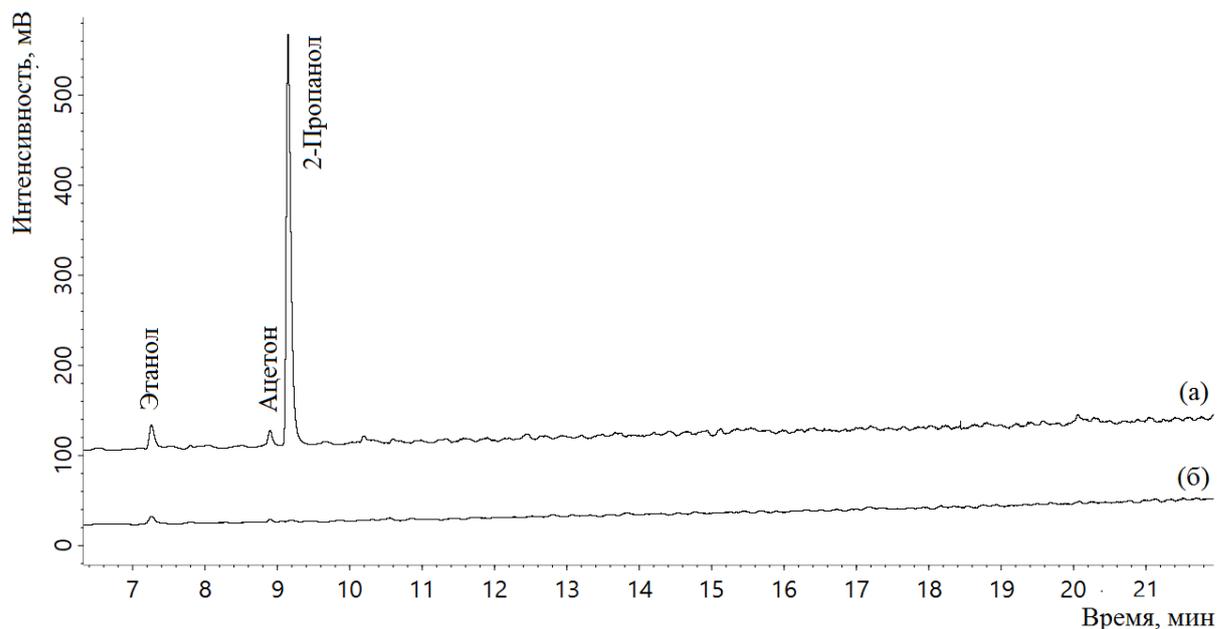
Таблица 15 – Производительность диагностических моделей

Выборка	Специфичность, % переменные (соотношения)	Чувствительность, % переменные (соотношения)	Производительность, % переменные (соотношения)
Обучающая выборка	98 (92)	88 (92)	93 (92)
Контрольная выборка	90 (100)	90 (90)	90 (95)
Тестовая выборка	100 (100)	100 (92)	100 (96)

Во всех образцах выдыхаемого воздуха площади пиков ацетона и изопрена оказались наибольшими. Ацетон является продуктом декарбоксилирования ацетил-Коа [175], а изопрен – основная молекула биосинтеза холестерина [54]. Исходя из литературных данных, изменения концентраций ацетона и изопрена в зависимости от наличия рака легких, неоднозначны: в одном случае концентрации этих соединений снижаются у пациентов с раком легкого [103], других – повышаются [126]. Согласно полученным экспериментальным данным площади пиков изопрена на выдыхаемом воздухе оказались значительно выше в случае пациентов с раком легких; статистически значимой взаимосвязи между площадями пика ацетона и статусом заболевания выявлено не было. Присутствие ацетонитрила, бензола и толуола в выдыхаемом воздухе в основном связывают с курением [49, 54, 85, 176], тем не менее, некоторые из этих компонентов были отмечены в различных исследованиях как биомаркеры рака легких [46, 145]. Отметим, что почти все образцы выдыхаемого воздуха содержали ацетонитрил. Бензол и толуол присутствовали более чем в 50% проб выдыхаемого воздуха, включая некурящих людей. Кроме того, количество некурящих людей значительно превышало количество курильщиков, что показывает, что присутствие этих соединений в выдыхаемом воздухе может быть обусловлено другими источниками. Биохимические пути возникновения ацетонитрила в организме на сегодняшний день еще не описаны, но скорость метаболизма ацетонитрила, поступающего в организм экзогенно, низкая, вследствие чего возможно постепенное выведение данного компонента через выдыхаемый воздух или мочу [42]. Насыщенные

углеводороды образуются в результате перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот свободными радикалами, появление которых обусловлено окислительным стрессом [162]. Спирты, альдегиды и кетоны образуются в результате дальнейшего окисления углеводов. Исходя из полученных результатов, среди предельных углеводов статистически значимую корреляцию наблюдали только для гексана, что согласуется с другими работами [132]. С другой стороны, эти же авторы позднее внесли гексан в список соединений, попадающих в организм экзогенно, так как данный компонент – один из загрязнителей окружающего воздуха [103]. Некоторые спирты, в частности этанол, относят к биомаркерам рака легких в исследованиях [47, 91], но присутствие этанола в выдыхаемом воздухе может быть обусловлено не только эндогенным фактором. Источниками этанола могут быть дезинфицирующие средства [62], зубная паста, конфеты и другие пищевые продукты [177]. При проведении исследований также обнаружили, что этанол слабо удерживается на сорбенте Тенакс ТА, следовательно, при анализе выдыхаемого воздуха в данных условиях этанол нельзя рассматривать как потенциальный биомаркер. 2-Пропанол может присутствовать в образцах дезинфицирующих средств, используемых в больницах, соответственно, необходимо корректно оценивать содержание 2-пропанола в окружающем воздухе. Для оценки экзогенного содержания 2-пропанола необходимо отбирать пробы выдыхаемого и окружающего воздуха непосредственно в больнице. Чтобы исследовать возможное экзогенное происхождение данного соединения, образцы выдыхаемого воздуха 9 здоровых добровольцев, в качестве которых выступал медицинский персонал, были взяты непосредственно в больнице в тех же условиях, что и 75 пациентов с раком легких. Обнаружили, что площади пиков 2-пропанола были выше в случае отбора проб в больнице как для пациентов с раком легких, так и для медицинского персонала, однако, значения площадей пиков 2-пропанола в окружающем воздухе были выше, чем в выдыхаемом воздухе у медицинских работников и у пациентов с раком легких. Вычитание концентрации 2-пропанола в окружающем воздухе из выдыхаемого воздуха привело к обнулению содержания 2-пропанола во всех

образцах, взятых в больнице. 2-Пропанол является одним из ЛОС, присутствующих в дезинфицирующих средствах, применяемых в больницах, поэтому площадь пика данного компонента в пробах окружающего воздуха больницы была высокой (рисунок 9). Некоторые исследователи [47, 101, 102, 139, 178] рассматривали 2-пропанол как биомаркер рака легких, тем не менее, правильная оценка влияния окружающего воздуха позволила подтвердить, что появление этого соединения в выдыхаемом воздухе, в основном, вызвано экзогенными факторами, а оценка содержания эндогенного 2-пропанола в выдыхаемом воздухе затруднена.



а – больница, б – в помещении без органических растворителей

Рисунок 9 – ГХ-ПВД хроматограммы окружающего воздуха, отобранные в различных местах

Исследования различных авторов отмечали увеличение концентраций таких альдегидов, как бутаналь [52, 53], пентаналь [47, 48, 51, 52], октаналь, нонаналь [51, 52, 87, 97] и кетоны: 2-бутанон [47, 90, 95, 103, 132], 2-пентанон [47, 48, 53, 55, 87], в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких. Выдыхаемый воздух может содержать альдегиды из-за перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, но некоторые альдегиды, например, бутаналь, также могут попадать в организм экзогенно, так как являются загрязнителями окружающего воздуха [51].

Количественно оценить содержание формальдегида и ацетальдегида, применяя условия анализа настоящего исследования, невозможно, однако экзогенное происхождение данных ЛОС отмечали и в других работах, что ставит под сомнение целесообразность их определения [47, 51, 179–181]. В экспериментальных исследованиях наблюдали статистически значимые отличия между площадями пиков бутанала, пентанала и 2-бутанона в группах пациентов с раком легких и здоровых добровольцев. Диметилсульфид и 1-метилтиопропан отмечали, как соединения, по которым возможно отличить больных раком легких от здоровых добровольцев [48]. В экспериментальных исследованиях данные ЛОС также обнаружили во многих образцах выдыхаемого воздуха, но их концентрации в группах больных и здоровых людей статистически значимо не отличались. Диэтиловый эфир относится к экзогенным соединениям, присутствующим в воздухе медицинских учреждений [103]. Диэтиловый эфир и этилацетат также детектировали в образцах выдыхаемого воздуха, однако статистически значимых отличий в исследуемых группах выявлено не было.

Источником этилбензола и ксилолов в выдыхаемом воздухе может быть загрязнение окружающего воздуха [182–186] или сигаретный дым [153–156]. С другой стороны, авторы [48, 76] отмечали статистически значимое отличие содержания ксилола в группах пациентов с раком легких и здоровых людей. В экспериментальных исследованиях данные ЛОС детектировали их только при ГХ-МС анализе образцов выдыхаемого воздуха, поскольку их содержание было чрезвычайно мало для обнаружения их методом ГХ-ПИД.

Лимонен может содержаться в выдыхаемом воздухе, он часто входит в состав моющих средств, косметики и продуктов питания [103, 187]. 2-Гептанон также обнаружили во многих образцах выдыхаемого воздуха, проанализированных методом ГХ-МС. Представляется интересным оценить корреляцию между его концентрацией и статусом заболевания после анализа большего количества образцов выдыхаемого воздуха [188].

### 2.5.3 Анализ образцов выдыхаемого воздуха с применением «электронного носа» и ГХ-МС

#### 2.5.3.1 Анализ образцов выдыхаемого воздуха с применением «электронного носа»

Образцы выдыхаемого воздуха 40 пациентов с раком легких и 40 здоровых людей, отобранные на 2 этапе исследования (таблица 7), были проанализированы с применением «электронного носа». Значения идентификационных параметров (таблица 16), рассчитанные для данных образцов выдыхаемого воздуха, сопоставили с табличными значениями (таблица 11). Учитывая, что одни и те же сенсоры чувствительны к существенно отличающимся по физико-химическим свойствам соединениям, провести однозначную интерпретацию данных достаточно сложно, однако, исходя из имеющихся литературных [189] и наблюдаемых данных, можно сказать, что основной отклик формируется ввиду большого количества водного конденсата в пробах, что существенно затрудняет интерпретацию данных.

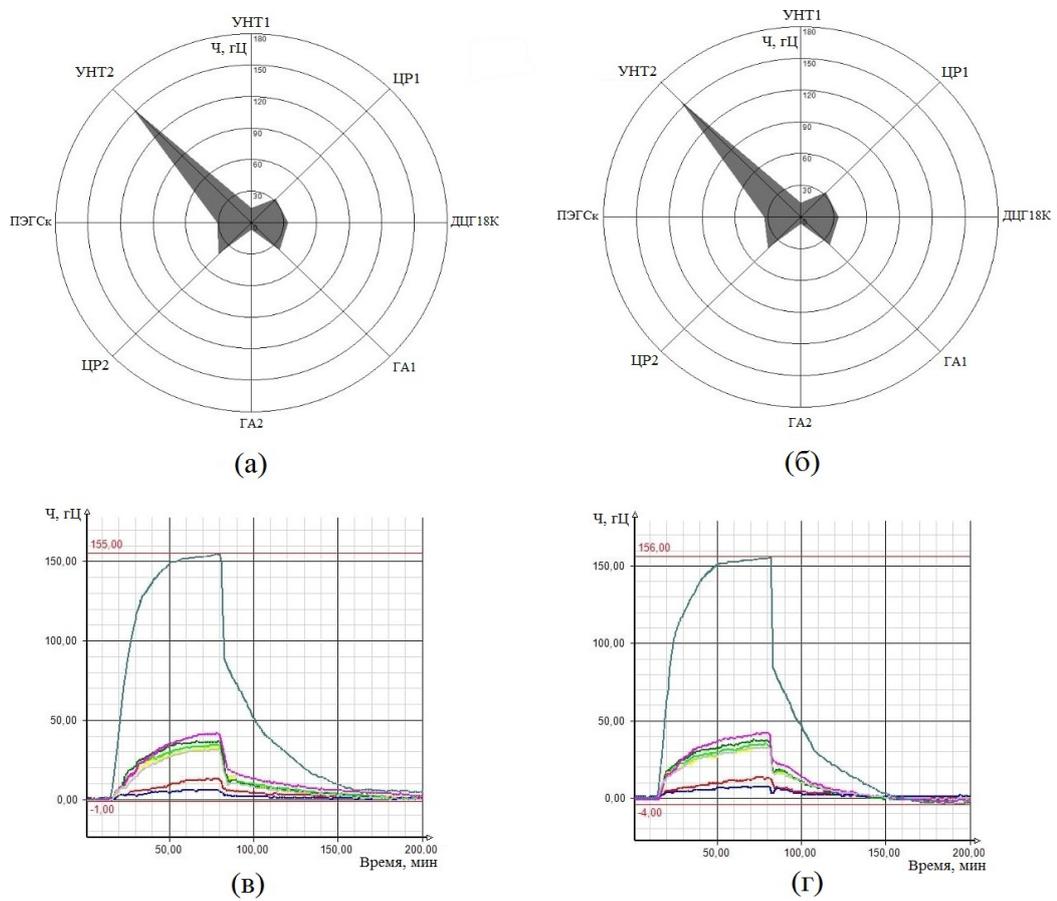
Выше отмечали влияние среды помещения на наблюдаемые результаты – наличием растворителей в моющих средствах, перепады температуры и влажности. При исследовании реальных образцов в контрольную группу здоровых добровольцев также были включены сотрудники больницы и отделения, в котором лежали пациенты с подтвержденной онкологией легких, что позволило минимизировать вариативность антропогенных факторов ввиду их идентичности и сопоставить результаты анализа проб выдыхаемого воздуха больных и здоровых людей.

Таблица 16 – Результаты идентификации ЛОС в образцах выдыхаемого воздуха

Идентиф. параметр	Значение	Соединение	Пациенты с раком легких, %	Здоровые, %
A1/2	0.34±0.03	Вода, бензиламин, третбутиламин	30	32
	0.42 ±0.05	Этанол, муравьиная кислота, уксусная кислота	53	55
	0.9±0.3	2-Пропанол, 1-бутанол, 2-бутанол, ацетон	10	8
A1/3	0.34±0.04	Вода	20	20
A1/4	0.34±0.05	Вода, метанол, этилендиамин	50	48
	0.53±0.07	Уксусная кислота, этанол, третбугимамин, бензиламин	8	5
A1/5	Больше 1.35	Вода, бензол, толуол, этилацетат, бутилацетат, гексан, диэтиловый эфир	80	78
A1/6	0.29±0.03	Вода, метанол, бензиламин, третбутиламин	10	13
	0.40±0.05	Муравьиная кислота, уксусная кислота, этанол	80	80
A1/7	0.40±0.05	Вода, ацетон, 1-бутанол, 2-бутанол, изоамиловый спирт	40	40
	0.8±0.2	Бензол, толуол, этилацетат, бутилацетат	30	28
A2/4	1±0.2	Вода	40	43
A2/5	5±1	Вода, аммиак	83	80
A2/8	0.45±0.10	Вода, изоамиловый спирт	38	40
A6/7	1.3±0.2	Вода	87	90

На рисунке 10 представлены диаграммы максимумов и временные хроночастотограммы проб выдыхаемого воздуха пациента с раком легких и здорового добровольца, измеренных в одинаковых условиях. Разность в площадях полученных отпечатков между больным и здоровым составила 2.13 %, а отличия между максимумами сорбции отдельно взятых сенсоров не превышали стандартное отклонение в условиях повторяемости (10%). Соответственно, результаты анализа проб выдыхаемого воздуха больного и здорового человека были идентичными, что говорит о том, что данная конфигурация «электронного носа» не позволяет дифференцировать пробы выдыхаемого воздуха больного и здорового человека. «Электронный нос» чувствителен к различным летучим

соединениям, однако, высокое содержание воды в образцах выдыхаемого воздуха перекрывает аналитический сигнал других летучих компонентов.



визуальные отпечатки пациентов с раком легких (а) и здорового добровольца (б), временные хроночастотограммы пациента с раком легких (в) и здорового добровольца (г)

Рисунок 10 – Типичные визуальные отпечатки и временные хроночастотограммы

### 2.5.3.2 Анализ выдыхаемого воздуха методом ГХ-МС

Проанализированные с применением «электронного носа» образцы были параллельно проанализированы методом ГХ-МС. Для повышения надежности получаемых результатов, как и в случае применения «электронного носа», производили вычитание фона с учетом вариативности сигнала в пределах 15%.

Частота появления ЛОС в выдыхаемом воздухе исследуемых групп пациентов с раком легких и здоровых добровольцев представлена в таблице 17. Этилбензол, ксилолы, пропилбензол, 1,3-пентадиен и 1,4-пентадиен не

рассматривали для статистического анализа, так как частота их присутствия в пробах была ниже 40% в обеих группах.

Таблица 17 – Частота появления ЛОС в образцах выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и здоровых людей

ЛОС	Здоровые добровольцы	Пациенты с раком легких
Ацетон	100.0	100.0
Ацетонитрил	95.0	67.5
Изопрен	100.0	100.0
2-Бутанон	82.5	77.5
1-Метилтиопропан	97.5	100.0
Алил метил сульфид	100.0	100.0
1-Метилтиопропен	97.5	100.0
Диметилсульфид	100.0	100.0
Диметил дисульфид	95.0	97.5
2-Пентанон	97.5	95.0
2,3-Бутандион	95.0	82.5
Бутаналь	45.0	57.5
Гексан	65.0	40.0
Бензол	22.5	45.0
Толуол	12.5	40.0
1-Пентанол	65.0	55.0
Декан	42.5	45.0
Нонан	50.0	25.0
Ундекан	60.0	50.0
Додекан	67.5	45.0
Тридекан	42.5	47.5
Пентаналь	75.0	47.5
Октан	42.5	40.0
3-Гептанон	50.0	42.5
2-Гептанон	52.5	62.5
Диметил трисульфид	40.0	77.5
Бензальдегид	70.0	60.0
Гептаналь	40.0	50.0
Нонаналь	62.5	65.0
Деканаль	57.5	45.0
Гептан	72.5	45.0
1-Бутанол	67.5	30.0
Гексаналь	87.5	52.5
Бутилацетат	52.5	17.5
Октаналь	52.5	67.5
1,3-Пентадиен	15.0	30.0

## Продолжение таблицы 17

ЛОС	Здоровые добровольцы	Пациенты с раком легких
1,4-Пентадиен	10.0	30.0
Этилбензол	7.5	20.0
м+п-Ксилол	7.5	12.5
о-Ксилол	10.0	12.5
Пропилбензол	10.0	20.0

Для выявления наиболее характерных отличий в профилях ЛОС выдыхаемого воздуха больных и здоровых людей применяли статистическую обработку полученных данных. Нормальность распределения данных проверяли с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Так как полученные данные не подчиняются нормальному закону распределения, для выявления статистически значимых корреляций показателей с заболеванием проводили непараметрический корреляционный анализ. В качестве показателей рассматривали не только площади пиков, но и их соотношения. В качестве знаменателя использовали компоненты, наиболее часто встречающиеся в пробах (более 86%): ацетон, ацетонитрил, изопрен, 2-бутанон, 1-метилтиопропан, аллил метил сульфид, 1-метилтиопропен, диметилсульфид, диметил дисульфид, 2-пентанон, 2.3-бутандион. В таблице 18 представлены соединения и соотношения, имеющие статистически значимую взаимосвязь со статусом заболевания ( $p$ -уровень  $< 0.05$ ).

Таблица 18 – Корреляционные коэффициенты потенциальных соединений-маркеров и их соотношений

Соединение / соотношение	Коэффициент корреляции
1-Метилтиопропен	0.224
Диметил дисульфид	0.227
2-Пентанон	0.276
Гексан	-0.300
Бензол	0.231
Толуол	0.304
Диметил трисульфид	0.424
1-Бутанол	-0.268
Гексаналь	-0.382
Бутилацетат	-0.339
Октаналь	0.271

## Продолжение таблицы 18

Соединение / соотношение	Коэффициент корреляции
Гексан / 2-Пентанон	-0.322
Бензол / Изопрен	0.239
Толуол / Изопрен	0.310
1-Пентанол / Ацетонитрил	-0.223
Ундекан / 2,3-Бутандион	-0.244
Додекан / 2,3-Бутандион	-0.426
Пентаналь / Ацетонитрил	-0.354
2-гептанон / Ацетонитрил	-0.221
Диметил трисульфид / Диметил дисульфид	0.451
Нонаналь / Ацетон	0.230
Деканаль / 2,3-Бутандион	-0.245
Гептан / 2,3-Бутандион	-0.233
1-Бутанол / 2,3-Бутандион	-0.371
Гексаналь / 2,3-Бутандион	-0.524
Бутаналь / Ацетон	0.257
Бутилацетат / 1-Метилтиопрпен	-0.379
Октаналь / Ацетон	0.297

Для построения диагностической модели использовали метод «случайный лес». Для обеспечения надежности выборку полученных результатов разделили на 3 равные части и для каждого типа моделей (на основе переменных или их соотношений). Строили 3 модели, в которых каждую из частей использовали как тестовую. Оценивали производительность моделей, где в качестве тестовых данных применяли весь массив данных. Производительности моделей представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Производительность диагностических моделей, построенных с использованием 3 различных разбиений данных на обучающую и тестовую выборки

Выборка			1	2	3
ЛОС	Обучающая выборка	Чувствительность, %	86	96	93
		Специфичность, %	73	85	81
	Тестовая выборка	Чувствительность, %	75	64	70
		Специфичность, %	50	62	69
Соотношения ЛОС	Обучающая выборка	Чувствительность, %	75	93	87
		Специфичность, %	90	92	92
	Тестовая выборка	Чувствительность, %	83	73	100
		Специфичность, %	80	85	77

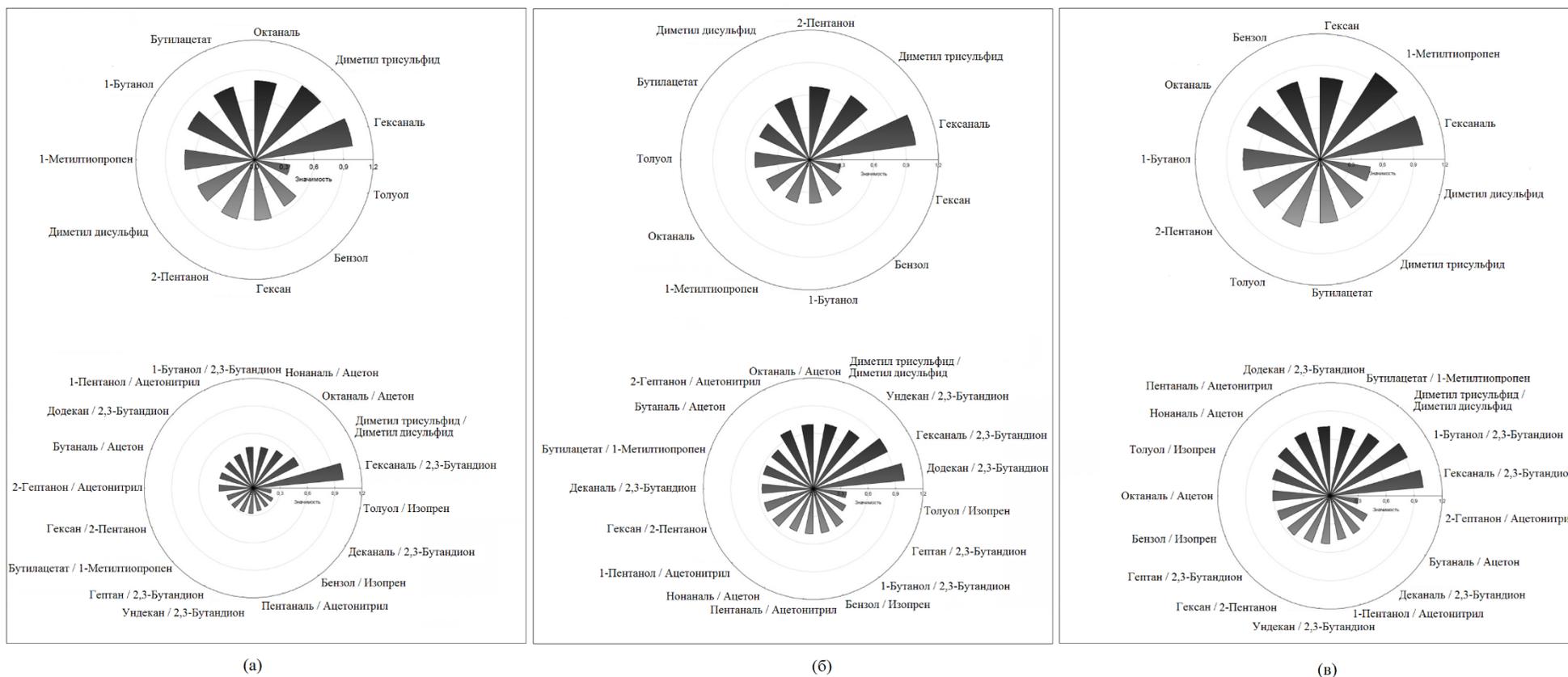
Как видно, на обучающей выборке чувствительность модели на основе соотношений площадей пиков ЛОС оказалась ниже, чем в моделях на основе площадей пиков вне зависимости от выборки. Однако, на тестовом наборе данных производительность модели на основе соотношений площадей пиков в целом значительно выше, что показывает преимущество использования соотношений площадей пиков ЛОС вместо площадей пиков ЛОС.

Случайный лес позволяет оценить вклад каждого из параметров, участвующих в построении модели, который исчисляется относительно наиболее важного параметра, значение которого равно 1. Для каждой модели площадей пиков и их соотношений строили полярные диаграммы важности предикторов (рисунок 11). Как видно, только гексаналь является одним из самых значимых среди площадей пиков ЛОС вне зависимости от набора данных. В случае отношений площадей пиков ЛОС значительными оказались гексаналь / 2,3-бутандион и диметилтрисульфид / диметилдисульфид.

В зависимости от набора данных существенно менялась важность остальных параметров, не позволяющая выделить и исключить из модели менее важные предикторы. Неоднозначность результатов на разных выборках свидетельствует о неустойчивости модели, что может быть связано с малым объемом выборки. Для создания надежной диагностической модели и определения конечного количества биомаркеров необходим значительно больший массив экспериментальных данных.

Следует отметить, что 7 соотношений из 8 (за исключением соотношения 2-бутанон / изопрен) также статистически значимы на данном этапе исследования, несмотря на использование другого детектора (МСД) и с участием другой группы добровольцев. Но в этом случае среди площадей пиков ЛОС повторяющихся компонентов было гораздо меньше: 2-пентанон, гексан, бензол и толуол. На данном этапе исследования рассматривали более широкий перечень ЛОС и их соотношений (таблица 18), что стало возможным за счет использования данных более чувствительного метода ГХ-МС. Применение соотношений площадей пиков ЛОС вместо площадей индивидуальных соединений является более эффективным, высокоточным и воспроизводимым подходом, преимущества которого показаны на 2 разных выборах с использованием 2 различных детекторов.

С применением ГХ-МС удастся различить образцы выдыхаемого воздуха больных раком легких и здоровых добровольцев по совокупности ЛОС или их соотношений с использованием методов статистического моделирования. «Электронный нос», будучи чувствительным к различным классам ЛОС, не способен распознать данные компоненты в выдыхаемом воздухе из-за водяного пара, содержание которого значительно превышает содержание ЛОС, что сказывается на корректности получаемых результатов. Данная конструкция «электронного носа» для анализа выдыхаемого воздуха не подходит ввиду наличия в образцах большого количества водяного пара [174].



а – набор данных 1, б – набор данных 2, в – набор данных 3

Рисунок 11 – Полярные диаграммы важности предикторов для моделей, построенных на основе площадей пиков ЛОС и их соотношений на разных наборах данных

## 2.6 Влияние различных факторов на состав ЛОС в выдыхаемом воздухе

Помимо большого разнообразия методов анализа и подготовки проб на профиль ЛОС могут оказывать влияние различные факторы, такие, как статус курения, воздействие загрязнителей воздуха, возраст, пол, диета, сопутствующие заболевания. Вследствие этого некоторые ЛОС могут быть ошибочно отнесены к биомаркерам. Например, в исследованиях [46, 132] были выявлены более высокие концентрации бензола и толуола у пациентов с раком легких, однако, данные ЛОС неоднократно отмечались как компоненты сигаретного дыма [155, 156], а также как загрязнители окружающей среды [183, 190, 191]. Авторы [162] показали, что изменения содержания некоторых алканов могут быть связаны с возрастом, однако, алканы также относят к маркерам рака легких [91]. Повышенную концентрацию изопрена обнаружили в выдыхаемом воздухе у пациентов с раком легких авторы [73, 135]. С другой стороны, авторы [163] отметили, что содержание изопрена значительно ниже в выдыхаемом воздухе женщин, чем мужчин, а также статистически значимую корреляцию содержания изопрена с возрастом. Повышение содержания ацетона в выдыхаемом воздухе наблюдали не только при раке легких [48, 108, 135], но и при сахарном диабете [192].

Для получения надежных результатов при выявлении биомаркеров, характерных для определенного заболевания, недостаточно принимать во внимание только информацию о статусе заболевания. Получение достоверных результатов более вероятно только при учете максимального количества факторов, способных повлиять на результаты.

Результаты ГХ-МС анализа проб выдыхаемого воздуха групп пациентов с раком легких и здоровых людей 2 этапа исследования (таблица 7) были обработаны не только с точки зрения «норма-патология», но и проанализированы на предмет влияния таких параметров как гендерная принадлежность и статус курения. Для этого соединения и соотношения, коррелирующие со статусом заболевания, проанализировали на предмет наличия статистически значимой взаимосвязи с гендерной принадлежностью и статусом курения (таблица 19).

Таблица 19 – Коэффициенты корреляции потенциальных соединений-маркеров и их соотношений со статусом курения и гендерной принадлежностью

Соединение, соотношение	Статус заболевания	Статус курения	Гендерная принадлежность
	Коэффициент корреляции		
1-Метилтиопропен	<b>0.224</b>	-0.125	<b>0.315</b>
Диметил дисульфид	<b>0.227</b>	-0.001	0.042
2-Пентанон	<b>0.276</b>	<b>0.365</b>	-0.065
Гексан	<b>-0.300</b>	0.083	-0.073
Бензол	<b>0.231</b>	<b>0.374</b>	0.194
Толуол	<b>0.304</b>	<b>0.296</b>	0.122
Диметил трисульфид	<b>0.424</b>	0.059	0.141
1-Бутанол	<b>-0.268</b>	0.074	-0.050
Гексаналь	<b>-0.382</b>	-0.040	<b>-0.240</b>
Бутилацетат	<b>-0.339</b>	-0.028	<b>-0.223</b>
Октаналь	<b>0.271</b>	-0.066	0.038
Гексан / 2-Пентанон	<b>-0.322</b>	0.014	-0.062
Бензол / Изопрен	<b>0.239</b>	<b>0.392</b>	<b>0.220</b>
Толуол / Изопрен	<b>0.310</b>	<b>0.296</b>	0.125
1-Пентанол / Ацетонитрил	<b>-0.223</b>	0.062	<b>-0.262</b>
Ундекан / 2,3-Бутандион	<b>-0.244</b>	-0.006	-0.190
Додекан / 2,3-Бутандион	<b>-0.426</b>	-0.052	-0.135
Пентаналь / Ацетонитрил	<b>-0.354</b>	-0.188	-0.175
2-гептанон / Ацетонитрил	<b>-0.220</b>	0.180	-0.156
Диметил трисульфид / Диметил дисульфид	<b>0.451</b>	0.109	0.175
Нонаналь / Ацетон	<b>0.230</b>	-0.054	0.047
Деканаль / 2,3-Бутандион	<b>-0.245</b>	-0.040	-0.112
Гептан / 2,3-Бутандион	<b>-0.233</b>	-0.027	-0.105
1-бутанол / 2,3-Бутандион	<b>-0.371</b>	0.045	-0.067
Гексаналь / 2,3-Бутандион	<b>-0.524</b>	-0.086	<b>-0.232</b>
Бутаналь / Ацетон	<b>0.257</b>	-0.079	-0.095
Бутилацетат / 1-Метилтиопропен	<b>-0.379</b>	-0.003	<b>-0.281</b>
Октаналь / Ацетон	<b>0.297</b>	-0.113	0.040

Примечание. Выделенные соотношения статистически значимы

Многие исследователи идентифицировали бензол, толуол и 2-пентанон как маркеры курения [47, 48, 55, 193], однако наши экспериментальные исследования показывают, что площади пиков данных компонентов коррелировали не только со статусом курения, но и заболеванием, при этом количество курильщиков было одинаковым в каждой из исследуемых групп.

Корреляцию данных соединений со статусом заболевания можно объяснить тем, что возраст здоровых курильщиков был значительно меньше, чем пациентов с раком легких, следовательно, стаж курения у здоровых был значительно меньше. Данные компоненты могут накапливаться в тканях опухоли и впоследствии выводиться из организма через выдыхаемый воздух. Площади пиков 1-метилтиопропена, гексаналя и бутилацетата статистически значимо отличались у мужчин и женщин. Выдыхаемый воздух относительно большой группы участников анализировали в исследовании [157], однако эти результаты не коррелировали с экспериментальными данными.

Для построения диагностических моделей использовали логистическую регрессию. Данные делили на обучающую (70% данных) и тестовую (30% данных) выборки. Строили 2 типа моделей: входные параметры 1 типа моделей включали в себя только параметры, коррелирующие исключительно со статусом заболевания (параметры, коррелирующие с гендерной принадлежностью и статусом курения, были исключены); в качестве входных параметров второго типа моделей использовали все, коррелирующие со статусом заболевания, включая коррелирующие с гендерной принадлежностью и статусом курения. Модель для каждого из типов моделей построена для соединений и для соотношений. Производительность моделей представлена в таблице 20.

Таблица 20 – Производительность диагностических моделей

Параметры, задействованные в построении модели	ЛОС		Соотношения ЛОС	
	Чувствитель- ность	Специфич- ность	Чувствитель- ность	Специфич- ность
Все соединения	97	93	58	72
Соединения, коррелирующие только со статусом заболевания	76	93	75	72
Все соотношения	97	93	75	81
Соотношения, коррелирующие только со статусом заболевания	97	96	83	81

Из полученных результатов видно, что исключение параметров, коррелирующих с другими факторами, не оказывает существенного влияния на производительность и даже позволило увеличить чувствительность на тестовом наборе. Построенные модели на основе соотношений оказались более устойчивыми к влиянию различных факторов, а их производительность были выше как на обучающей, так и тестовой выборке. В полученных экспериментальных результатах распределение по гендерному признаку и статусу курения было сопоставимо, что позволило значительно снизить влияние данных факторов, однако, их следует принимать во внимание для снижения вероятности получения ложноотрицательных и ложноположительных результатов [194].

## 2.7 Вариативность профилей ЛОС пациентов с раком легких в зависимости от различных факторов

### 2.7.1 Вариативность профилей ЛОС выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких в зависимости от гистологического типа и локализации опухоли

Результаты исследований разных авторов по выявлению биомаркеров в профилях ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых людей имеют ряд значимых отличий, которые могут быть обусловлены как разностью подходов к отбору и анализу образцов, так и разночтениями в интерпретации данных [55, 56, 70, 77, 84]. Отличия могут быть обусловлены тем, что в разных исследованиях анализируются разные по составу выборки, прежде всего, среди пациентов, что может вносить значительную неопределенность. Представляло интерес изучение профилей ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких различных гистологических типов и выявление признаков, характерных для конкретного гистологического типа заболевания.

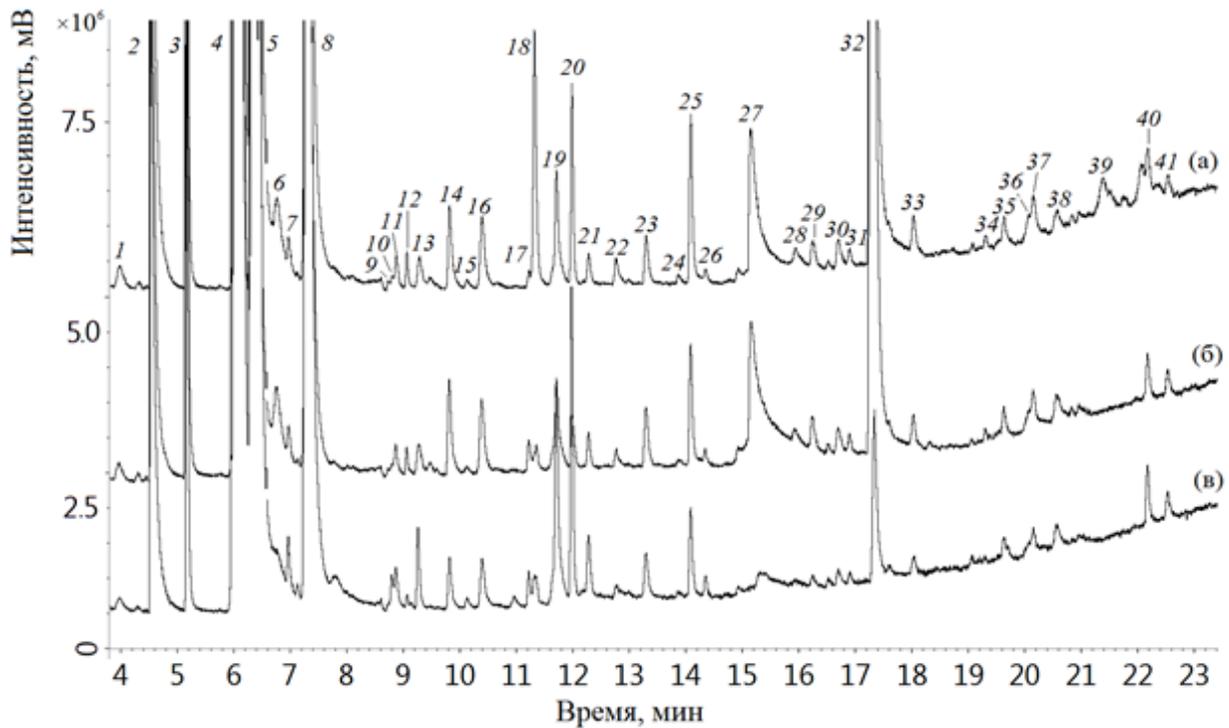
Опухоль может быть локализована в центральной части легкого, в частности в крупных и сегментарных бронхах, также в периферических отделах легочной ткани. Симптоматика и лечение опухоли в зависимости от локализации

существенно отличаются: поражение мелкого бронха обычно не вызывает кашель и других проявлений, характерных для центрального рака, с чем связаны трудности своевременной диагностики [195]. Возможно, опухоль, локализованная в периферических отделах легочной ткани, меньше влияет на профиль ЛОС в выдыхаемом воздухе в связи с удаленностью образования от дыхательных путей, поэтому одной из задач настоящего исследования являлось изучение профилей ЛОС онкобольных в зависимости от локализации опухоли.

Параметрами для выявления наиболее характерных отличий в профилях ЛОС выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких разных гистологических типов и разной локализации опухоли рассматривали как индивидуальные компоненты, так и их соотношения.

Образцы выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких, отобранные в ходе 3 этапа исследования (таблица 7) анализировали по гистологическому типу и локализации опухоли. Для этого из общей выборки выбирали образцы выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких трех наиболее часто встречающихся гистологических типов: 40 пациентов – аденокарцинома, 31 – плоскоклеточный рак легких и 9 – мелкоклеточный рак легких. Среди данных пациентов у 40 опухоль находилась в центральной части легкого, остальных 40 – периферической.

На рисунке 12 представлены хроматограммы проб выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких разных гистологических типов и локализации, полученные в режиме регистрации полного ионного тока.



а – мелкоклеточный рак, б – аденокарцинома, в – плоскоклеточный рак; в случаях а и в опухоль локализована в центральной части легкого, в случае б – в периферической части легкого.

Рисунок 12 – Хроматограммы проб выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких разных гистологических типов: 1 – изобутан, 2 – этанол, 3 – ацетонитрил, 4 – ацетон, 5 – 2-пропанол, 6 – диметилсульфид, 7 – диэтиловый эфир, 8 – изопрен, 9 – бутаналь, 10 – 2,3-бутандион, 11 – 2-бутанон, 11 – диметилкарбонат, 12 – этилацетат, 13 – 2-метилпентан, 14 – гексан, 15 – 1-бутанол, 16 – бензол, 17 – пентанон-2, 18 – алилметилсульфид, 19 – 1-метилтиопропан, 20 – 1-метилтиопропен, 21 – гептан, 22 – 1-пентанол, 23 – толуол, 24 – фурфураль, 25 – гексаналь, 26 – бутилацетат, 27 – N,N-диметилацетамид, 28 – этилбензол, 29 – оксилол, 30 – м-ксилол + п-ксилол, 31 – гептаналь, 32 – фенол, 33 – бензальгегид, 34 – 2-пентилфуран, 35 – октаналь, 36 – 2-этилгексанол-1, 37 – ундекан, 38 – лимонен, 39 – додекан, 40 – нонаналь, 41 – тридекан

Полученные данные анализировали статистически с использованием непараметрических тестов Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса. В таблицах 21 и 22 представлены соединения и соотношения, площади пиков которых статистически значимо отличались в группах онкобольных с разной локализацией опухоли и разным гистологическим типом ( $p$ -уровень  $< 0.05$ ).

Таблица 21 – Соединения и их соотношения, статистически значимо отличающиеся в группах пациентов с раком легких с разной локализацией опухоли (тест Манна-Уитни)

Соединение / соотношение	<i>p</i> -уровень
1-Пентанол	0.035
2-Бутанон / 2-Пентанон	0.040
Диметилдисульфид / 2,3-Бутандион	0.017
1-Пентанол / 2,3-Бутандион	0.005
Бутаналь / 2,3-Бутандион	0.022

Таблица 22 – Соотношения, статистически значимо отличающиеся в группах онкобольных с разным гистологическим типом (тест Краскела-Уоллиса)

Соотношение ЛОС	<i>p</i> -уровень
1-Метилтипропан / Диметилдисульфид	0.0485
Диметилдисульфид / 1-Метилтипропен	0.0494
Ундекан / Алилметилсульфид	0.0424

Обнаружены статистически значимые различия в зависимости от локализации опухоли и ее гистологического типа. Состав выдыхаемого воздуха относительно локализации опухоли ранее не изучали, поэтому полученные результаты необходимо подтвердить с использованием более широкой выборки добровольцев из всех групп. В других работах [56, 70, 74, 95, 147] отмечены различия компонентного состава ЛОС пациентов с различным гистологическим типом опухоли, в наших исследованиях различие профилей выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких в зависимости от гистологического типа наблюдали только в случае использования соотношений ЛОС [196].

### 2.7.2 Сравнительная характеристика до и послеоперационных профилей ЛОС из выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и пациентов с доброкачественными опухолями

Классическая схема эксперимента представляет собой исследование профилей ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых людей и построения классификационной модели на основании набора компонентов,

наиболее отличающихся в исследуемых группах. Зачастую в исследованиях задействуют только пациентов, еще не проходивших лечения, однако, дополнительным подтверждением того, что изменения содержания ЛОС действительно обусловлены заболеванием, может послужить информация, полученная в результате исследования профиля ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких после до и после операции: если изменение в профиле ЛОС в выдыхаемом воздухе обусловлено опухолью, то, вероятно, после удаления опухоли из организма профиль ЛОС будет меняться. С другой стороны, нередко сопоставляют профили ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и здоровых добровольцев без каких-либо легочных патологий, однако, некоторые легочные заболевания, например, доброкачественные опухоли невозможно отличить от рака легких при диагностике с помощью КТ, вследствие чего для установления диагноза в большинстве случаев требуется хирургическое вмешательство, поэтому особый интерес представляет не только сопоставление групп «норма-патология», но и групп со злокачественным и доброкачественным образованиями в легких.

Сравнивали профили ЛОС в выдыхаемом воздухе пациентов с раком легких и пациентов с доброкачественными опухолями до и после операции. В эксперименте принимали участие 12 добровольцев: 7 пациентов с раком легких и 5 – с доброкачественными опухолями. Пробы выдыхаемого воздуха отбирали перед и после операции перед выпиской пациента.

Далее изучали изменение качественного состава образцов, полученных до и после операции (таблица 23). Как видно из полученных результатов, в большинстве случаев после операции не обнаруживали аллилметилсульфида как среди пациентов со злокачественной, так и с доброкачественной опухолью. Ранее аллилметилсульфид не отмечали, как биомаркер рака легких, однако он входил в состав соотношения, статистически значимо отличающегося у пациентов с раком легких разных гистологических типов. Также наблюдали уменьшение процента пациентов, у которых после операции наблюдали толуол, этилбензол и гептан. Качественный состав выдыхаемого воздуха до и после операции менялся, но

характер этого изменения был идентичен как для злокачественных, так и доброкачественных опухолей.

Таблица 23 – Частота появления ЛОС у пациентов с раком легких и доброкачественными опухолями до и после операции

ЛОС	Вся выборка, %	Рак легких, %		Доброкачественная опухоль, %	
		До операции	После операции	До операции	После операции
Ацетон	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Изопрен	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Диметилсульфид	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Диметил дисульфид	95.8	100.0	85.7	100.0	100.0
1-Метилтиопропан	87.5	85.7	100.0	60.0	100.0
2-Пентанон	87.5	100.0	85.7	60.0	100.0
1-Метилтиопропен	83.3	100	85.7	60.0	80.0
Ацетонитрил	83.3	100	71.4	100.0	60.0
2,3-Бутандион	83.3	85.7	85.7	80.0	80.0
Гексан	66.7	71.4	57.1	100.0	40.0
Диметил трисульфид	62.5	85.7	57.1	60.0	40.0
2-Бутанон	54.2	28.5	71.4	40.0	80.0
Аллилметилсульфид	45.8	100.0	14.3	60.0	0.0
Гептан	50.0	71.4	28.5	100.0	0.0
Гексаналь	50.0	71.4	57.1	20.0	60.0
Бензальдегид	45.8	57.1	28.5	20.0	80.0
Толуол	41.7	71.4	0.0	80.0	20.0
Этилбензол	41.7	71.4	0.0	60.0	40.0
Пентаналь	37.5	14.2	42.8	20.0	80.0
Октан	37.5	42.8	28.5	20.0	40.0
1-Пентанол	37.5	42.8	28.5	20.0	40.0
Нонаналь	37.5	42.8	28.5	20.0	60.0
Додекан	37.5	42.8	42.8	0.0	40.0
Октаналь	37.5	42.8	28.5	20.0	40.0
Бутаналь	29.2	14.2	28.5	20.0	60.0
Деканаль	20.8	42.8	14.3	0.0	20.0
м+п-Ксилол	20.8	57.1	0.0	0.0	20.0
о-Ксилол	20.8	57.1	0.0	0.0	20.0
Бензол	20.8	57.1	14.3	0.0	0.0
Пропилбензол	16.7	42.8	0.0	0.0	20.0
Нонан	12.5	14.2	0.0	20.0	20.0

## Продолжение таблицы 23

ЛОС	Вся выборка, %	Рак легких, %		Доброкачественная опухоль, %	
		До операции	После операции	До операции	После операции
Ундекан	12.5	28.5	0.0	20.0	0.0
Бутилацетат	12.5	28.5	0.0	0.0	20.0
Гептаналь	12.5	14.2	14.3	0.0	20.0

На следующем этапе проводили статистическую обработку полученных данных. В качестве параметров использовали площади пиков соединений и их соотношения. Учитывая малый размер выборки, для оценки значимости изменений параметров до и после операции использовали непараметрический критерий Уилкоксона для связанных выборок. Данный критерий использовали только для тех соединений и их соотношений, которые присутствовали в более 50% образцов во всех 4 рассматриваемых группах: в группах с доброкачественными или злокачественными опухолями до или после операции, а именно: ацетон, изопрен, диметилсульфид, диметилдисульфид, 1-метилтиопропан, 2-пентанон, 1-метилтиопропен, ацетонитрил и 2,3-бутандион.

В таблице 24 представлены параметры, статистически значимо изменяющиеся до и после операции в группах пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями. Стоит отметить, что площадь пика ни одного из рассматриваемых соединений статистически значимо не отличалась в выдыхаемом воздухе пациентов до и после резекции; такие изменения наблюдались только для соотношений ЛОС. Среди пациентов с доброкачественной опухолью статистически значимые изменения после операции наблюдали только для соотношения диметилдисульфид / 2-пентанон, но в случае со злокачественной опухолью – для 6 соотношений (таблица).

Таблица 24 – Параметры, статистически значимо меняющиеся после операции в группах пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями

Доброкачественные опухоли	
Параметр	<i>p</i> -уровень
Диметилдисульфид / 2-Пентанон	0.043
Злокачественные опухоли	
Параметр	<i>p</i> -уровень
Диметилдисульфид / Ацетон	0.043
1-Метилтиопропан / 1-Метилтиопропен	0.028
1-Метилтиопропен / Диметилсульфид	0.018
1-Метилтиопропен / Ацетон	0.028
1-Метилтиопропен / Изопрен	0.018
2,3-Бутандион / Диметилсульфид	0.046

В выдыхаемом воздухе пациентов присутствовали компоненты, соотношения которых статистически значимо отличались у пациентов до и после операции, но среди них нет соотношений ЛОС, рассматриваемых ранее в качестве потенциальных биомаркеров. В первую очередь, это может быть обусловлено небольшой выборкой количества соединений, рассматриваемых для количественного анализа. Также необходимо отметить, что в проводимых ранее исследованиях в качестве группы сравнения рассматривали здоровых людей без патологий легких, а в данном исследовании также учитывали пациентов с доброкачественными опухолями. В исследованиях других авторов [49] наблюдали статистически значимое снижение концентрации изопрена после операции у пациентов с раком легких, но в данной работе подобные зависимости не наблюдали. Наблюдаемые другими авторами [49, 134] соединения, концентрации которых менялись после резекции, не рассматривали ввиду их отсутствия в большинстве изученных образцов. Из полученных результатов видно, что удаление доброкачественной и злокачественной опухоли по-разному влияет на профили наиболее часто встречающихся в выдыхаемом воздухе пациентов ЛОС. Интерес представляло сопоставление полученных результатов с результатами исследований, предполагающих вовлечение большего количества пациентов с

раком легких и здоровых людей и рассматривающих в качестве параметров не только ЛОС, но и их соотношения [197].

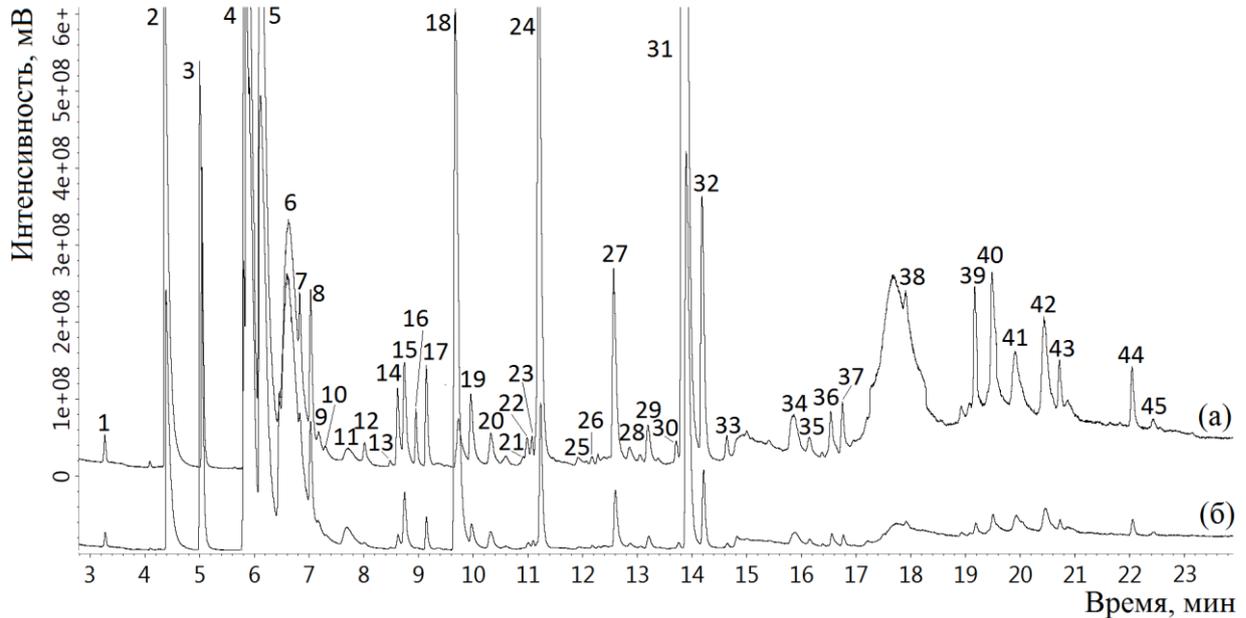
### 2.7.3 Идентификация потенциальных биомаркеров рака легких в опухолевых тканях

На сегодняшний день, биохимические пути метаболизма присутствующих в выдыхаемом воздухе многих ЛОС не изучены должным образом. Одним из косвенных доказательств того, что изменения профиля ЛОС в выдыхаемом воздухе обусловлены активностью опухолевой ткани, можно полагать исследование профилей содержащихся непосредственно в опухолевых тканях ЛОС.

Концентрирование летучих органических соединений, выделяемых опухолевыми тканями, проводили в статическом режиме с применением сорбционных трубок. При изучении профилей летучих органических соединений в тканях, во многих исследованиях концентрирование осуществляют при температуре, близкой к температуре тела – 37 °С [91, 149, 177]. При больших температурах эффективность извлечения ЛОС может быть выше, поскольку температуры кипения многих аналитов выше 37 °С. С другой стороны, повышение температуры может способствовать деградации матрицы пробы и, соответственно, извлечению из пробы компонентов, нехарактерных для нормального функционирования организма.

Исходя из вышесказанного, сравнивали результаты, полученные при анализе образца ткани, разделенного на 2 части и термостатированного в течение 10 минут при 37 и 50 °С. Температуру 50 °С выбрали исходя из посыла, что при данной температуре может протекать более эффективная экстракция аналитов из пробы, большее количество соединений будет переходить в воздушную фазу над пробой. С другой стороны, при данной температуре не будет проходить денатурация основных белков, что исключает появление нежелательных компонентов в профиле ЛОС. В данном эксперименте использовали образец с наибольшей массой (№1), а именно, опухолевую ткань саркомы низкодифференцированной (8.8 г), а также образец здоровой ткани вокруг данной опухоли (10.0 г) (рисунок 13).

Образцы помещали в колбу объемом 1 л, закрывали силиконовой крышкой, термостатировали в течение 10 минут, после чего концентрировали 500 мл воздуха с помощью аспиратора и силиконового шланга со скоростью 200 мл/мин.



а – нагрев при 37 °С, б – нагрев при 50 °С

Рисунок 13 – ГХ-МС хроматограммы по полному ионному току образцов ткани саркомы низкодифференцированной после нагрева в течение 10 мин (1 – ацетальдегид, 2 – этанол, 3 – ацетонитрил, 4 – ацетон, 5 – 2-пропанол, 6 – севофлуран, 7 – метилацетат, 8 – диэтиловый эфир, 9 – пентан, 10 – 1-пропанол, 11 – гексафторизопропанол, 12 – метакролеин, 13 – метилвинилкетон, 14 – бутаналь, 15 – 2-бутанон, 16 – диметилкарбонат, 17 – этилацетат, 18 – гексан, 19 – 1-бутанол, 20 – бензол, 21 – 1-петнен-3-он, 22 – 1-петнен-3-ол, 23 – 2-пентанон, 24 – пентаналь, 25 – 3-метил-3-бутен-1-ол, 26 – гептан, 27 – 1-пентанол, 28 – 2-пентеналь, 29 – толуол, 30 – 2-метил-2-пентаналь, 31 – гексаналь, 32 – бутилацетат, 33 – этилформиат, 34 – циклогексанон + о-ксилол, 35 – м-ксилол + з-ксилол, 36 – 2-гептанон, 37 – гептаналь, 38 – бензальдегид, 39 – 2-пентил-фуран, 40 – октаналь, 41 – 2-этил-1-гексанол, 42 – лимонен, 43 – 1,2-нонандиен, 44 – нонаналь, 45 – ундекан)

Содержания большинства из присутствующих в пробе компонентов, как и прогнозировали, оказались значительно выше в случае выдерживания пробы при 50 °С (рисунок 13), поэтому в дальнейшем анализировали данные, полученные при данной температуре.

При пробоотборе для анализа тканей в установленных условиях, а именно, при перекачивании 0.5 л воздуха над образцом из колбы объемом 1 л со скоростью 200 мл/мин, наблюдали снижение скорости пропускания воздуха через сорбент, приводившее к нарушению работы аспиратора из-за разряжения воздуха в колбе, поэтому для последующих исследований отбирали меньший объем образца (0.3 л). Были проанализированы 4 образца № 2 - 5 (0.8, 0.9, 0.4, и 1.1 г, соответственно). Площади пиков практически всех присутствующих в пробах ЛОС были практически идентичны площадям пиков в образце окружающего воздуха, отобранного параллельно с пробой, за исключением некоторых соединений. В образце № 2 содержание ЛОС выше фоновых наблюдали относительно ацетонитрила, ацетона, севофлурана, N,N-диметилформамида и N,N-диметилацетамида, 3 образце – повышенное содержание относительно фона 2-метил-1-пропена, ацетонитрила, ацетона, 2-пропанола, севофлурана, диэтилового эфира, 3-гексил-1-ола, изопрена, метакролеина, гексана, 1-бутанола, бензола, пентанала, толуола, гексаналя, бутилацетата, образце № 4 – севофлурана, диэтилового эфира, 1-пропанола, диметилкарбоната, образце № 5 – ацетона, 2-пропанола, севофлурана, метакролеина, 2-пентанона, пентанала, гексаналя (таблица 25). В дальнейших исследованиях увеличили время выдерживания пробы при 50 °С до 15 мин (образец № 6; 0.1 г) и 30 мин (образец № 7; 0.3 г) с целью обеспечить более полное извлечение компонентов из пробы. В образце № 6 наблюдали высокие содержания ацетонитрила, ацетона, 2-пропанола, севофлурана, метилацетата, 2-пропанол-2-метила, метакролеина, метилвинилкетона, бутанала, 2-бутанона, диметилкарбоната, этилацетата, в образце № 7 – 2-пропанола, севофлурана, 2-бутанона, этилацетата, 1-пропанол-2-метила, гексана, 1-бутанола, бензола, 3-метил-3-бутен-1-ола, 2-бромгексана, бутилацетата, p-ксилола, гептанала (таблица 25). В образце № 7 наблюдали значительное повышение концентраций таких компонентов, как 2-пропанол и севофлуран относительно всех остальных проб. Присутствие данных ЛОС в пробах обусловлено экзогенными факторами, а именно: 2-пропанол используется в качестве дезинфицирующего средства в медицинских учреждениях, а севофлуран входит в состав анестезии, используемой

при проведении операции. Учитывая, что масса образца № 7 относительно мала и составляет 0.3 г, для образцов с большей массой при выдерживании столь длительное время возможен перегруз детектора за счет большего извлечения данных компонентов. Поэтому, все следующие образцы выдерживали при 50 °С в течение 15 минут.

В дальнейших исследованиях предприняли попытку повысить концентрацию ЛОС над пробой в воздухе колбы за счет их концентрирования в колбе меньшего объема, а именно, 0.75 л (образцы № 8-10; 1.0, 1.5 и 0.2 г, соответственно) путем выдерживания образца при 50 °С в течение 15 минут. При таком уменьшении объема не наблюдали нарушений работы аспиратора. В образце № 8 содержания ЛОС выше фона наблюдали относительно 2-пропанола, севофлурана, 1-пропанола, 2-метилбутана, бутаналь, 2-бутанона, этилацетата, бутилацетата, образце № 9 – ацетона, 2-пропанола, севофлурана, 2-метил-2-пропанола, метакролеина, метилвинилкетона, бутаналь, 2-бутанона, этилацетата, бензола, 2-пентанона, пентаналь, 10 – ацетонитрила, 2-пропанола, севофлурана, диэтилового эфира, гексана (таблица 25). Полученные результаты имели удовлетворительную сходимость с предыдущими.

В процессе постепенного разряжения воздуха в колбе с образцом при пропускании объема пробы через сорбционные трубки скорость пропускания воздуха через трубку снижается, следствием чего может быть нарушение работы аспиратора. При снижении скорости пропускания воздуха над пробой через сорбционную трубку отбираемый объем воздуха над пробой можно увеличить без нарушения работы аспиратора. В этих условиях процедура отбора пробы займет больше времени, в течение которого возможно дополнительное извлечение аналитов из пробы в случае пресыщения аналитами воздуха над пробой. Образцы № 11-15 (1.4, 1.6, 7.6, 4.5, и 2.8 г, соответственно) выдерживали в течение 15 мин при 50 °С в колбе объемом 0.5 л, и пропускали через сорбционную трубку 375 мл воздуха над пробой со скоростью 50 мл/мин, это не привело к нарушению работы аспиратора. В образцах № 11, 13 и 15 концентрации ЛОС были выше, чем в образцах № 12 и 14 (таблица 25).

Образцы № 16 и 17 (4.5 и 2.8 г.) были измельчали с целью повышения эффективности извлечения аналитов. Образец с большей массой содержал большее количество ЛОС (таблица 25).

Насколько повлияли попытки оптимизировать условия концентрирования на результат, оценить сложно, поскольку условия концентрирования были применены к различным образцам. Также отметим, что массы разных образцов варьировали в широком диапазоне, что могло существенно повлиять на результаты.

При сравнении хроматограмм, полученных при анализе опухолевой ткани саркомы низкодифференцированной и здоровой ткани вокруг данной опухоли наблюдали одинаковую картину как по качественному составу, так и по интенсивностям хроматографических пиков практически всех соединений, за исключением диметилкарбоната, как при 37 °С, так и при 50 °С. Однородность состава могла быть обусловлена несколькими причинами: во-первых, образец здоровой ткани отбирали вокруг опухоли, поэтому здоровая ткань уже могла содержать в себе опухолевые клетки; во-вторых, образцы могут идентичными за счет того, что после извлечения ткани после операции, как здоровая, так и опухолевая ткани некоторое время находились в одной емкости, что могло привести к взаимному проникновению ЛОС из одной пробы в другую и в результате их уравнивание; в третьих, извлечение ткани из живого организма и, соответственно, прекращение всех обменных происходящих при функционировании ткани в организме процессов также может быть причиной идентичности профилей ЛОС из больной и здоровой тканей. Площадь пика диметилкарбоната была выше в образце опухолевой ткани. Это обусловлено тем, что диметилкарбонат является компонентом, входящим в состав дезинфицирующих средств в медицинских учреждениях.

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что присутствующие в выдыхаемом воздухе ЛОС присутствуют в опухолевых тканях в значительно меньшем количестве образцов [188].

Таблица 25 – ЛОС, идентифицированные в опухолевых тканях

Компонент\Образец	Саркома	Метастаз	Аденокарцинома															%
	низкодифференцированная	аденокарциномы	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Ацетонитрил	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	47
Ацетон	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	65
2-Пропанол	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	82	
Севофлуран	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	
Изопрен	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	
1-Пропанол	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	35	
2-метил-2-пропанол	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	29	
Гексафторизопропиловый спирт	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	94	
Диэтиловый эфир	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	35	
Метакролеин	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	35	
Метил винил кетон	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	35	
Бутаналь	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	24	
2-Бутанон	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	47	
Диметилкарбонат	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	
Этилацетат	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	53	
Гексан	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	35	
1-Бутанол	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	29	
Бензол	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	24	
2-Бромгексан	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	12	

Продолжение таблицы 25

Компонент\Образец	Саркома низкодифференцированная	Метастаз аденокарциномы	Аденокарцинома															%
			3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Компонент\Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Пентанон	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	35
Пентаналь	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	29
Гептан	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	12
1-Пентанол	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	18
Толуол	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	18
Гексаналь	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	12
Гексаналь	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	41
Бутилацетат	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	35
о-Ксилол	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	12
м-Ксилол + п-Ксилол	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	18
3-Гептанон	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	18
2-Гептанон	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	18
Гептаналь	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	24

## 2.8 Расширение выборки для диагностики и статистическое моделирование

### 2.8.1 ГХ-МС анализ проб выдыхаемого воздуха расширенной выборки добровольцев

Для повышения надежности диагностической модели размер выборки на 3 этапе исследования расширили до 112 пациентов с раком легких и 120 здоровых людей (таблица 7). Частота появления ЛОС в образцах выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и здоровых людей представлена в таблице 26.

Таблица 26 – Частота появления ЛОС в пробах выдыхаемого воздуха исследуемых групп добровольцев

ЛОС	Пациенты с раком легких	Здоровые добровольцы
Ацетон	100.0	100.0
Изопрен	100.0	100.0
Диметилсульфид	100.0	100.0
1-Метилтипропен	100.0	92.5
1-Метилтипропан	98.2	95.0
Алил метил сульфид	98.2	96.7
Диметил дисульфид	97.3	93.3
2-Пентанон	97.3	99.1
2,3-Бутандион	87.5	91.6
Ацетонитрил	86.6	88.3
Диметил трисульфид	71.4	55.0
Гексан	50.9	61.6
Гептан	52.7	73.3
Октан	50.9	50.0
1-Пентанол	56.2	59.1
2-Бутанон	75.9	85.8
2-Гептанон	54.4	50.8
3-Гептанон	50.9	52.5
Пентаналь	50.0	71.7
Октаналь	51.2	51.6
Нонаналь	52.7	55.8
Толуол	50.9	32.5
Бензальдегид	58.0	56.7

## Продолжение таблицы 26

ЛОС	Пациенты с раком легких	Здоровые добровольцы
1-Бутанол	24.1	49.2
Нонан	36.6	45.8
Декан	49.1	48.3
Ундекан	44.6	49.1
Додекан	45.6	49.1
Бутаналь	36.7	48.3
Гексаналь	49.1	49.2
Гептаналь	39.2	47.5
Деканаль	42.0	49.2
1,3-Пентадиен	25.0	15.2
1,4-Пентадиен	22.3	10.0
Бензол	31.2	21.7
Этилбензол	25.0	12.5
Пропилбензол	44.6	13.3
<i>o</i> -Ксилол	20.5	13.3
<i>m+n</i> -Ксилол	19.6	12.5
Бутилацетат	21.4	48.3

## 2.8.2 Статистический анализ данных и моделирование

В качестве параметров для статистической обработки данных использовали площади пиков ЛОС в выдыхаемом воздухе. Учет контаминации компонентами окружающего воздуха осуществляли путем вычитания площади пика компонента в образце окружающего воздуха из образца выдыхаемого воздуха. Отрицательные результаты вычитания приравнивали к нулю. Для снижения влияния на результат попадаемых из окружающего воздуха компонентов в пробу и повышения надежности результатов использовали только соединения, концентрации которых были как минимум на 20% выше, чем в окружающей среде. Для повышения надежности результатов рассматривали только соединения, встречающиеся в более чем 50% случаев (таблица 27): ацетон, ацетонитрил, изопрен, 2-бутанон, 1-метилтиопропан, аллил метил сульфид, 1-метилтиопропен, диметилсульфид, диметилдисульфид, 2-пентанон, 2,3-бутандион, гексан, толуол, 1-пентанол, гептан, пентаналь, октан, 3-гептанон, 2-гептанон, диметилтрисульфид, бензальдегид,

октаналь, нонаналь. Учитывая большую достоверность использования значения соотношений площадей пиков, доказанное с использованием разных групп участников исследования и разное оборудование, в дальнейшем интерпретировали данные по этому показателю. Для статистического анализа использовали соотношения площадей пиков соединений к основным пикам, встречающимся в более чем 86% образцов, и соотношения основных соединений.

Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Так как распределение данных отличалось от нормального, для выявления статистически значимых корреляций между параметрами и статусом заболевания использовали непараметрический тест ранговой корреляции Спирмена ( $p = 0.05$ ).

Таблица 27 – Корреляционные коэффициенты, рассчитанные для всех соотношений

Соединение	Ацетон	Аллил метил сульфид	1- Метилтипропан	Диметил дисульфид	2-Пентанон	2,3-Бутандион
Гексан	-0.262	-0.253	-0.204	-0.230	<b>-0.309</b>	-0.289
Толуол	<b>0.252</b>	0.224	0.237	0.247	0.220	0.249
1-Пентанол	<b>0.136</b>	0.006	0.061	0.075	0.070	-0.029
Пентаналь	-0.205	-0.304	-0.262	-0.207	<b>-0.346</b>	-0.285
Диметил трисульфид	0.265	0.203	0.201	<b>0.271</b>	0.185	0.082
Нонаналь	0.021	-0.036	-0.039	-0.034	-0.092	<b>-0.153</b>
Гептан	-0.074	<b>-0.157</b>	-0.109	-0.108	-0.144	-0.144
2-Бутанон	-0.153	-0.139	-0.106	-0.107	<b>-0.320</b>	-0.208
Изопрен	<b>-0.227</b>	0.007	0.037	0.000	-0.175	-0.110
1-Метилтипропан	<b>-0.149</b>	0.043	0.038	0.113	-0.012	-0.055
Диметилсульфид	<b>-0.205</b>	0.037	0.117	-0.008	-0.204	-0.159
Ацетонитрил	<b>-0.269</b>	-0.053	-0.008	0.002	-0.160	-0.171
Бензальдегид	0.089	0.035	0.065	0.050	-0.008	-0.065
Октаналь	0.062	-0.016	0.006	0.040	-0.033	-0.097
Октан	0.101	0.048	0.074	0.075	0.011	0.065
3-Гептанон	0.006	-0.034	-0.030	-0.027	-0.050	-0.052
2-Гептанон	0.083	0.044	0.030	0.097	0.030	-0.041

Примечание. Выделенные соотношения задействованы в построении диагностических моделей

Диагностические модели строили на основе соотношений с наиболее высокими статистически значимыми коэффициентами корреляции, за исключением дублирующих (таблица 28).

Таблица 28 – Коэффициенты корреляции соотношений, задействованных в построении диагностических моделей

Соотношение	Коэффициент корреляции
Гексан / 2-Пентанон	-0.309
Толуол / Ацетон	0.252
1-Пентанол / Ацетон	0.136
Пентаналь / 2-Пентанон	-0.346
Диметил Трисульфид / Диметил дисульфид	0.271
Нонаналь / 2,3-Бутандион	-0.530
Гептан / Аллил метил сульфид	-0.157
2-Бутанон / 2-Пентанон	-0.320
Изопрен / Ацетон	0.227
1-Метилтиопроан / Ацетон	-0.149
Диметилсульфид / Ацетон	0.205
Ацетонитрил / Ацетон	-0.269

Набор данных случайным образом разделили на 2 выборки: обучающую и тестовую. Для обеспечения надежности выборку полученных результатов разделили на 3 равные части и для каждого типа моделей (на основе каждого из алгоритмов машинного обучения) строили 3 модели, в которых каждую из частей использовали как тестовую.

Исследовали различные алгоритмы машинного обучения (логистическая регрессия, случайный лес, метод опорных векторов и ИНС) для создания диагностической модели с максимальной чувствительностью и специфичностью. Среди методов оптимизации алгоритма логистической регрессии наилучшие результаты получили с применением оптимизации Розенбрасса и Квазиньютона.

Метод опорных векторов может использоваться с линейной и нелинейной функцией ядра. Исследовали линейные, полиномиальные, сигмоидальные и радиальные базисные функции. Наилучший результат получили при использовании радиальной базисной функции. Параметр  $\gamma$  влияет на точность обучения: большие значения приводят к переобучению, но в случае малых

значений ядро постепенно сводится к постоянной функции. Исследовали диапазон значений  $\gamma$  от 0.008 до 1.800. Значение 0.080 сочли оптимальным, поскольку при более низких значениях точность модели была ниже, а использование больших значений приводило к увеличению производительности модели на обучающем наборе данных без повышения точности на тестовом наборе данных.

В случае применения алгоритма случайного леса изучили влияние разного количества предикторов на производительность модели. Наивысшая точность на тестовой и на обучающей выборках достигалась с использованием 5 предикторов.

Для создания диагностической модели с максимальной чувствительностью и специфичностью также рассматривали нейронные сети типа многослойный персептрон с одним скрытым слоем. Была протестирована тысяча различных топологий нейронных сетей и выбрана лучшая нейронная сеть. Скрытый слой включал 5 нейронов, а выходной слой содержал 2 нейрона, определяющие принадлежность добровольца к группе пациентов с раком легких или здоровых людей. Для обучения нейронных сетей использовался алгоритм Бройдена - Флетчера - Голдфарба - Шанно. В качестве функции активации скрытого слоя использовали сигмоиду, выходного слоя – гиперболический тангенс.

Для каждой модели рассчитывали чувствительность и специфичность как для обучающих, так и для тестовых данных на разных выборках. Затем провели сравнение диагностической точности построенных моделей (таблица 29).

Таблица 29 – Производительность диагностических моделей с использованием 3 различных разбиений данных на обучающую и тестовую выборки

Алгоритм машинного обучения	Обучающая выборка, %						Тестовая выборка, %					
	Чувствительность			Специфичность			Чувствительность			Специфичность		
Выборка	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Логистическая регрессия	78	79	84	78	77	75	80	79	71	76	69	81
Случайный лес	86	88	92	85	87	79	79	79	75	80	80	73
Метод опорных векторов	77	80	73	80	89	71	79	82	70	83	66	78
Нейронные сети	89	88	87	85	85	75	88	85	82	86	80	81

Вариативность результатов, полученных различными исследовательскими группами [76, 97, 101, 102] может быть обусловлена многими факторами, среди которых тот факт, что статистическая обработка данных осуществляется с использованием различных алгоритмов машинного обучения, где процент тестовых наборов данных может составлять от 15 до 50%, созданные диагностические модели имеют различную производительность. Предлагаемый нами подход к анализу данных с использованием соотношений площадей пиков ЛОС продемонстрировала свою эффективность путем создания диагностических моделей с использованием различных алгоритмов машинного обучения.

При проведении анализа выдыхаемого воздуха большой группы людей исследования проводили методом ГХ-МС, позволяющим рассматривать широкий спектр ЛОС и их соотношений. Нами сопоставлена эффективность разных подходов к классификации для выбора оптимального, позволяющего правильно классифицировать наибольшее количество образцов. Среди алгоритмов машинного обучения основной областью применения логистической регрессии и метода опорных векторов является бинарная классификация, позволяющая применять данные алгоритмы для решения поставленной задачи. Алгоритм случайного леса является более гибким, позволяет рассматривать более широкий диапазон возможных взаимосвязей между предикторами модели (соотношениями ЛОС) и рассматриваемым классификационным признаком (наличием или отсутствием заболевания). Также был рассмотрен один из наиболее широко используемых в медицинской диагностике алгоритмов – нейронные сети. Чувствительность и специфичность на тестовом наборе данных оказались выше 66% для всех алгоритмов машинного обучения, но показатели варьировали в зависимости от применяемого классификационного алгоритма, поэтому целесообразным представлялось оценка эффективности нескольких алгоритмов и выбора наиболее эффективного. Среди всех алгоритмов машинного обучения производительность нейронных сетей оказалась наиболее высокой: на тестовом наборе данных чувствительность составила 82 – 88%, специфичность – 80 – 86%, учитывая, что в данном исследовании достаточно весомая часть данных, 30%,

отнесена к тестовой выборке. Стоит отметить, что пробы для анализа отбирали натошак, а количество курильщиков было примерно одинаковым, что, возможно, позволило нивелировать дополнительное мешающее влияние различных факторов на профиль ЛОС в выдыхаемом воздухе. Курильщики не могут быть исключены из исследования, т.к. большинство пациентов с раком легких являются активными курильщиками. С другой стороны, фактор курения существенно меняет профиль ЛОС в выдыхаемом воздухе [153, 198–200], поэтому целесообразно нивелирование эффекта курения путем уравнивания количества курильщиков в группах пациентов с раком легких и здоровых людей во избежание получения ложноположительных результатов.

Имеющая наибольшую производительность модель легла в основу программного приложения, позволившего путем ввода результатов ГХ-МС исследования (по площадям хроматографических пиков ЛОС) рассчитать соотношения и установить наличие / отсутствие заболевания у предоставившего пробу выдыхаемого воздуха для анализа добровольца [201]. Диалоговое окно программного приложения с введенными данными и выведенным результатом представлено на рисунке 14.

Прогнозирование рака легких методом нейронных сетей

Номер карты: 293259

Расчет

Результат: Вероятность высокая

гексан / 2-пентанон гексан 1938436 2-пентанон 0	толуол / ацетон толуол 0 ацетон 23085330	1-пентанол / ацетон 1-пентанол 0 ацетон 23085330	пентаналь / 2-пентанон пентаналь 3647 2-пентанон 0
диметилтрисульфид / диметилдисульфид диметилтрисульфид 9299 диметилдисульфид 53032	нонаналь / 2,3-бутандион нонаналь 0 2,3-бутандион 63134	гептан / аллил метил сульфид гептан 0 аллил метил сульфид 7189	2-бутанон / 2-пентанон 2-бутанон 13186 2-пентанон 0
изопрен / ацетон изопрен 10704518 ацетон 23085330	1-метилпропан / ацетон 1-метилпропан 73908 ацетон 23085330	диметилсульфид / ацетон диметилсульфид 836958 ацетон 23085330	ацетонитрил / ацетон ацетонитрил 13095575 ацетон 23085330

Рисунок 14 – Диалоговое окно программного приложения

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены, оптимизированы условия газохроматографического (ГХ-ПИД и ГХ-МС) определения летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе. Оптимальные условия анализа - применение PLOT-колонок (дивинилбензол) в сочетании с концентрированием аналитов на сорбентах типа Тенакс ТА (Поли (2,6-дифенил-р-фениленоксид)) при перекачивании 0.5 л пробы выдыхаемого воздуха через сорбент со скоростью 200 мл/мин. Проведен анализ выдыхаемого воздуха, идентифицирован перечень основных содержащихся в выдыхаемом воздухе ЛОС (ацетонитрил, ацетон, изопрен, бутаналь, 2-бутанон, гексан, бензол, пентаналь, 1-пентанол, толуол, 1-метилтиопропан, диметилсульфид, 2-пентанон, диэтиловый эфир, этилацетат, этилбензол, м-ксилол, п-ксилол, о-ксилол, 2-гептанон, 2,3-бутандион, гексаналь, диметилкарбонат, лимонен).

2. Проведен хемометрический анализ результатов ГХ-ПИД анализа выдыхаемого воздуха. Построены диагностические модели с применением нейронных сетей на основе площадей пиков ЛОС и их соотношений. Точность диагностических моделей обоих типов на тестовой выборке превышала 90%.

3. Изучены аналитические характеристики «электронного носа» на основе пьезосенсоров и оценена возможность ее применения для диагностики рака легких по результатам анализа выдыхаемого воздуха 40 пациентов с раком легких и 40 здоровых людей. Выявлено, что существенное влияние на формирование аналитического сигнала оказывают пары воды, которые не позволяют дифференцировать выдыхаемый воздух пациентов с раком легких и здоровых добровольцев.

4. Показана эффективность диагностической модели диагностики рака легких с применением метода случайный лес по соотношениям ЛОС выдыхаемого воздуха 40 пациентов с раком легких и 40 здоровых людей, определенных методом ГХ-МС. Чувствительность моделей на тестовой выборке при анализе индивидуальных ЛОС составляла 64 – 75%, по их соотношениям 73 – 100%. Специфичность модели с использованием индивидуальных ЛОС находилась в

диапазоне 50 – 69%, по их соотношениям 77 – 85%. Рассмотрено влияние гендерной принадлежности и статуса курения на состав выдыхаемого воздуха и на точность диагностических моделей. Построенные на основе соотношений ЛОС модели оказались более устойчивыми к влиянию различных факторов, а их производительность была выше как на обучающей, так и на тестовой выборках.

5. Выявлены параметры профиля ЛОС, отличающиеся в зависимости от гистологического типа и локализации опухоли. Среди пациентов со злокачественной и доброкачественной опухолью в большинстве случаев после операции не обнаруживали аллилметилсульфид, перечень остальных отличающихся параметров был различен для доброкачественной и злокачественной опухоли. Статистически значимые различия относительно гистологического типа не наблюдали для индивидуальных ЛОС, но они были выявлены для некоторых их соотношений

6. ГХ-МС анализ опухолевых тканей показал, что наиболее часто присутствующие в выдыхаемом воздухе ЛОС обнаруживаются в опухолевых тканях в меньшем количестве образцов.

7. Построены диагностические модели по соотношениям ЛОС с применением различных алгоритмов машинного обучения, из которых наибольшую производительность имели нейронные сети. Разработано программное приложение, позволяющее с высокой вероятностью диагностировать рак легких (чувствительность – 88%, специфичность – 86%).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sung, H. Global cancer statistics 2020 / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol. 71. – P. 209–249.
2. Siegel, R. L. Cancer statistics, 2020 / R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol. 71. – № 1. – P. 7–30.
3. Sung, H. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol. 71. – № 3. – P. 209–249.
4. Malvezzi, M. European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer / M. Malvezzi, G. Carioli, P. Bertuccio [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2017. – Vol. 28. – № 5. – P. 1117–1123.
5. Black, W. C. Cost-effectiveness of CT screening in the National Lung Screening Trial / W. C. Black, I. F. Gareen, S. S. Soneji [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – Vol. 371. – № 19. – P. 1793–1802.
6. Xu, Y. Lung cancer diagnosis in CT images based on Alexnet optimized by modified Bowerbird optimization algorithm / Y. Xu, Y. Wang, N. Razmjoooy // *Biomed. Signal Process. Control.* – 2022. – Vol. 371. – № 19. – P. 1793–1802.
7. Borczuk, A. C. Molecular signatures in biopsy specimens of lung cancer / A. C. Borczuk, L. Shah, G. D. N. Pearson [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2004. – Vol. 170. – № 2. – P. 167–174.
8. Mazzone, P. Bronchoscopy and needle biopsy techniques for diagnosis and staging of lung cancer / P. Mazzone, P. Jain, A. C. Arroliga [et al.] // *Clin. Chest Med.* – 2002. – Vol. 23. – № 1. – P. 137–158.
9. Nardi-Agmon, I. Exhaled breath analysis for monitoring response to treatment in advanced lung cancer / I. Nardi-Agmon, M. Abud-Hawa, O. Liran [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2016. – Vol. 11. – № 6. – P. 827–837.
10. Antoniou, S. X. The potential of breath analysis to improve outcome for patients with lung cancer / S. X. Antoniou, E. Gaude, M. Ruparel [et al.] // *J. Breath Res.* – 2019. – Vol. 13. – № 3. – art. 034002.

11. Janssens, E. Volatile organic compounds in human matrices as lung cancer biomarkers: a systematic review / E. Janssens, J. P. Meerbeeck, K. Lamote // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2020. – Vol. 153. – art. 103037.

12. Cheng, Z. Comparative proteomics analysis of exhaled breath condensate in lung cancer patients / Z. Cheng, A. K. Chan, C. R. Lewis [et al.] // *J. Cancer Therapy.* – 2011. – №2. – P. 1–8.

13. Campanella, A. Exhaled breath condensate biomarkers for lung cancer / A. Campanella, S. Summa, S. Tommasi // *J. Breath Res.* – 2019. – Vol. 2. – art. 044002.

14. Ma, L. Comparative proteomic analysis of exhaled breath condensate between lung adenocarcinoma and CT-detected benign pulmonary nodule patients / L. Ma, G. Xiu, J. Muscat [et al.] // *Cancer Biomark.* – 2022. – Vol. 34. – № 2. – P. 163–174.

15. Afsin, E. DNA investigation in the exhaled breath condensate (EBC) in non-small cell lung cancer / E. Afsin, M. Polatli, G. Bozkurt // *Exp. Biomed. Res.* – 2022. – Vol. 5. – № 2. – P. 165–174.

16. Hayes, S. A. Exhaled breath condensate for lung cancer protein analysis: a review of methods and biomarkers / S. A. Hayes, S. Haefliger, B. Harris [et al.] // *J. Breath Res.* – 2015. – Vol. 10. – № 3. – art. 034001.

17. Lopez-Sanchez, L. M. Exhaled breath condensate biomarkers for the early diagnosis of lung cancer using proteomics / L. M. Lopez-Sanchez, B. Jurado-Gamez, N. Feu-Collado [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2017. – Vol. 313. – № 4. – P. 664–676.

18. Hanai, Y. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer / Y. Hanai, K. Shimono, K. Matsumura [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2012. – Vol. 76. – № 4. – P. 679–684.

19. Zhang, C. Urine proteome profiling predicts lung cancer from control cases and other tumors / C. Zhang, W. Leng, C. Sun [et al.] // *EBioMedicine.* – 2018. – Vol. 30. – P. 120–128.

20. Haince, J.-F. Metabolomic fingerprinting for the detection of early-stage lung cancer: from the genome to the metabolome / J.-F. Haince, P. Joubert, H. Bach [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – № 3. – art. 1215.

21. Taunk, K. Urinary volatome expression pattern: paving the way for identification of potential candidate biosignatures for lung cancer / K. Taunk, P. Porto-Figueira, J. A. M. Pereira [et al.] // *Metabolites*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – art. 36.

22. Carrola, J. Metabolic Signatures of Lung Cancer in Biofluids: NMR-Based Metabonomics of Urine / J. Carrola, C. M. Rocha, A. S. Barros [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2011. – Vol. 10. – № 1. – P. 221–230.

23. Zhang, C. Urine proteome profiling predicts lung cancer from control cases and other tumors / Z. Chang, W. Leng, C. Sun [et al.] // *EBioMedicine*. – 2018. – V. 30. – P. 120–128.

24. Silva, C. Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers – A powerful strategy for breast cancer diagnosis / C. Silva, M. Passos, J. Camara [et al.] // *Talanta*. – 2012. – Vol. 89. – P. 360–368.

25. Sun, Y. Comparative proteomic analysis of exosomes and microvesicles in human saliva for lung cancer / Y. Sun, C. Huo, Z. Qiao [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2018. – Vol. 17. – № 3. – P. 1101–1107.

26. Xiao, H. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry / H. Xiao, L. Zhang, H. Zhou [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2011. – Vol. 11. – № 2. – art. 012112.

27. Jiang, X. High-throughput salivary metabolite profiling on an ultralow noise tip-enhanced laser desorption ionization mass spectrometry platform for noninvasive diagnosis of early lung cancer / X. Jiang, X. Cheng, J. Yu [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2021. – Vol. 20. – № 9. – P. 4346–4356.

28. Bel'skaya, L.V. Salivary metabolic profile of patients with lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease of varying severity and their comorbidity: A preliminary study / L. V. Bel'skaya, E. A. Sarf, D. V. Solomatin [et al.] // *Diagnostics*. – 2020. – Vol. 10. – № 12. – art. 1095.

29. Takamori, S. Differential diagnosis of lung cancer and benign lung lesion using salivary metabolites: A preliminary study / S. Takamori, S. Ishikawa, J. Suzuki // *J. Proteome Res.* – 2022. – Vol. 13. – № 3. – P. 460–465.

30. Dent, A. G. Exhaled breath analysis for lung cancer / A. G. Dent, T. G. Sutedja, P. V. Zimmerman // *J. Thorac. Dis.* – 2013. – Vol. 5. – № 11. – P. 540–550.

31. Marzorati, D. A review of exhaled breath key role in lung cancer diagnosis / D. Marzorati, L. Mainardi, G. Sedda [et al.] // *J. Breath Res.* – 2019. – Vol. 13. – № 3. – art. 034001.

32. Ratiu, I. A. Volatile organic compounds in exhaled breath as fingerprints of lung cancer, asthma and COPD / I. A. Ratiu, T. Ligor, V. Bocos-Bintintan [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2020. – Vol. 10. – № 1. – art. 32.

33. Scheepers, M. Diagnostic Performance of Electronic Noses in Cancer Diagnoses Using Exhaled Breath: A Systematic Review and Meta-analysis / M. Scheepers, Z. Al-Difaie, L. Brandts [et al.] // *JAMA Netw. Open.* – 2022. – Vol. 5. – № 6. – art. e2219372.

34. Binson, V. A. Exhaled breath volatile organic compound analysis for the detection of lung cancer – a systematic review / V. A. Binson, M. Subramoniam // *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering.* – 2022. – Vol. 56. – P. 17–35.

35. Hekiem, N. L. L. Advanced vapour sensing materials: Existing and latent to acoustic wave sensors for VOCs detection as the potential exhaled breath biomarkers for lung cancer / N. L. L. Hekiema, A. A. M. Ralib, M. A. M. Hattar [et al.] // *Sens. Actuator B.* – 2021. – Vol. 329. – art. 112792.

36. Gasparri, R. Diagnostic biomarkers for lung cancer prevention / R. Gasparri, R. Romano, G. Sedda // *J. Breath Res.* – 2018. – Vol. 12. – № 2. – 027111.

37. Costello, B. L. A review of the volatiles from the healthy human body / B.L. Costello, A. Amann, H. Al-Kateb, // *J. Breath Res.* – 2014. – Vol. 8. – № 1. – art. 014001.

38. Phillips, M. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans / M. Phillips, J. Herrera, S. Krishnan [et al.] // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 1999. – Vol 11. – № 729. – P. 1529–1538.

39. Smith, D. Volatile metabolites in the exhaled breath of healthy volunteers: their levels and distributions / D. Smith, C. Turner, P. Spanel // *J. Breath Res.* – 2007. – Vol. 1. – № 1. – art. 014004.

40. Buszewski, B. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases / B. Buszewski, M. Keszy, T. Ligor [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 2007. – Vol. 21. – № 6. – P. 553–566.

41. Tang, Y. Metabolomics workflow for lung cancer: discovery of biomarkers / Y. Tang, Z. Li, L. Lazar [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2019. – Vol. 495. – P. 436–445.

42. Hakim, M. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways / M. Hakim, Y. Y. Broza, O. Barash [et al.] // *Chem. Rev.* – 2012. – Vol. 112. – № 11. – P. 5949–5966.

43. Gordon, S. M. Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer / S. M. Gordon, J. P. Szidon, B. K. Krotoszynski // *Clin. Chem.* – 1985. – Vol. 31. – № 8. – P. 1278–1282.

44. O'Neill, H. J. A computerized classification technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer / H. J. O'Neill, S. M. Gordon, M. H. O'Neill [et al.] // *Clin. Chem.* – 1988. – Vol. 34. – № 8. – P. 1613–1618.

45. Preti, G. Analysis of lung air from patients with bronchogenic carcinoma and controls using gas chromatography-mass spectrometry / G. Preti, J. N. Labows, J. G. Kostelc [et al.] // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* – 1998. – Vol. 432. – P.1–11.

46. Phillips, M. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study / M. Phillips, K. Gleeson, J. M. B. Hughes [et al.] // *Early Report.* – 1999. – Vol. 353. – № 9168. – P.1930–1934.

47. Rudnicka, J. Determination of volatile organic compounds as potential markers of lung cancer by gas chromatography-mass spectrometry versus trained dogs / J. Rudnicka, M. Walczak, T. Kowalkowski [et al.] // *Sens. Actuator B.* – 2014. – Vol. 202. – P.615–621.

48. Ulanowska, A. The application of statistical methods using VOCs to identify patients with lung cancer / A. Ulanowska, T. Kowalkowski, E. Trawinska [et al.] // *J. Breath Res.* – 2011. – Vol. 5. – № 4. – art. 046008.

49. Poli, D. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study / D. Poli, P. Carbognani, M. Corradi [et al.] // *Respir. Res.* – 2005. – Vol. 6. – № 1. – art. 71.

50. Rudnicka, J. Determination of Volatile Organic Compounds as Biomarkers of Lung Cancer by SPME–GC–TOF/MS and Chemometrics / J. Rudnicka, T. Kowalkowski, T. Ligor [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol. 879. – № 30. – P. 3360–3366.

51. Fuchs, P. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer / P. Fuchs, C. Loeseken, J.K. Schubert [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2009. – Vol. 126. – P. 2663–2670.

52. Poli, D. Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatisation SPME-GH/MS / D. Poli, M. Goldoni, M. Corradi [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2010. – Vol. 878. – № 27. – P. 2643–2651.

53. Buszewski, B. Identification of volatile lung cancer markers by gas chromatography–mass spectrometry: Comparison with discrimination by canines / B. Buszewski, T. Ligor, T. Jeziński [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – Vol. 404. – № 1. – P. 141–146.

54. Ligor, T. The analysis of healthy volunteers' exhaled breath by the use of solid-phase microextraction and GC-MS / T. Ligor, M. Ligor, A. Amann [et al.] // *J. Breath Res.* – 2008. – Vol. 2. – № 4. – art. 046006.

55. Ligor, T. Application of an artificial neural network model for selection of potential lung cancer biomarkers / T. Ligor, L. Pater, B. Buszewski // *J. Breath Res.* – 2015. – Vol. 9. – № 2. – art. 027106.

56. Song, G. Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients / G. Song, T. Qin, H. Liu [et al.] // *Lung Cancer.* – 2010. – Vol. 67. – № 2. – P. 227–231.

57. Lawal, O. Exhaled breath analysis: a review of 'breath-taking' methods for off-line analysis / O. Lawal, W. M. Ahmed, T. M. E. Nijsen [et al.] // *Metabolomics.* – 2017. – Vol. 13. – № 10. – art. 110.

58. Miekisch, W. Impact of sampling procedures on the results of breath analysis / W. Miekisch, S. Kischkel, A. Sawacki [et al.] // *J. Breath Res.* – 2008. – Vol. 2. – № 2. – art. 026007.

59. Velde, S. Differences between alveolar air and mouth air / S. Velde, M. Quirynen, P. Hee [et al.] // *Anal. Chem.* – 2007. – Vol. 79. – № 9. – P. 3425–3429.

60. Dragonieri, S. An Electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD / S. Dragonieri, J. T. Annema, R. Schot [et al.] // *Lung Cancer*. – 2009. – Vol. 64. – № 2. – P. 166–170.

61. O'Hara, M. E. Development of a protocol to measure volatile organic compounds in human breath: a comparison of rebreathing and on-line single exhalations using proton transfer reaction mass spectrometry / M. E. O'Hara, S. O'Hehir, S. Green [et al.] // *Physiol. Meas.* – 2008. – Vol. 29. – № 3. – P. 309–330.

62. Bikov, A. Standardised exhaled breath collection for the measurement of exhaled volatile organic compounds by proton transfer reaction mass spectrometry / A. Bikov, K. Paschalaki, R. Logan-Sinclair [et al.] // *BMC Pulm. Med.* – 2013. – Vol. 13. – art. 43.

63. Bikov, A. Expiratory flow rate, breath hold and anatomic dead space influence electronic nose ability to detect lung cancer / A. Bikov, M. Hernadi, B. Z. Korosi [et al.] // *BMC Pulm. Med.* – 2014. – Vol. 14. – 202.

64. Steeghs, M. M. L. The suitability of tedlar bags for breath sampling in medical diagnostic research / M. M. L. Steeghs, S. M. Cristescu, F. J. M. Harren // *Physiol. Meas.* – 2007. – Vol. 28. – № 1. – P. 73–84.

65. Pesesse, R. Multimodal chemometric approach for the analysis of human exhaled breath in lung cancer patients by TD-GC × GC-TOFMS / R. Pesesse, P. H. Stefanuto, F. Schleich [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2019. – Vol. 1114–1115. – P. 146–153.

66. Горбунов, И. С. Оптимизация условий анализа выдыхаемого воздуха методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии для целей неинвазивной диагностики рака легких / И. С. Горбунов, А. Р. Губаль, А. А. Ганеев [и др.] // *Журн. аналит. химии*. – 2019. – Т. 74. – № 11. – С. 870–884.

67. Tsou, P. H. Exploring volatile organic compounds in breath for high-accuracy prediction of lung cancer / P. H. Tsou, Z. L. Lin, Y. C. Pan [et al.] // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 6. – art. 1431.

68. Gasparri, R. Volatile signature for the early diagnosis of lung cancer / R. Gasparri, M. Santonico, C. Valentini [et al.] // *J. Breath Res.* – 2016. – Vol. 10. – № 1. – art. 016007.

69. Wang, Y. The analysis of volatile organic compounds biomarkers for lung cancer in exhaled breath, tissues and cell lines / Y. Wang, Y. Hu, D. Wang [et al.] // *Cancer Biomark.* – 2012. – Vol. 11. – № 4. – P. 129–137.

70. Saidi, T. Non-invasive prediction of lung cancer histological types through exhaled breath analysis by UV-irradiated electronic nose and GC/QTOF/MS / T. Saidi, M. Moufid, K. J. Beleno-Saenz [et al.] // *Sens. Actuators B: Chem.* – 2020. – Vol. 311. – art. 127932.

71. Wang, C. Exploratory study on classification of lung cancer subtypes through a combined k-nearest neighbor classifier in breathomics / C. Wang, Y. Long, W. Li [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10. – № 1. – art. 5880.

72. Callol-Sanchez, L. Observation of nonanoic acid and aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer / L. Callol-Sanchez, M. A. Munoz-Lucas, O. Gomez-Martin [et al.] // *J. Breath Res.* – 2017. – Vol. 11. – № 2. – art. 026004.

73. Rudnicka, J. Searching for selected VOCs in human breath samples as potential markers of lung cancer / J. Rudnicka, T. Kowalkowskia, B. Buszewski // *Lung Cancer.* – 2019. – Vol. 135. – P. 123–129.

74. Mazzone, P. J. Progress in the development of volatile exhaled breath signatures of lung cancer / P. J. Mazzone, X. F. Wang, S. Lim [et al.] // *Ann. Am. Thorac. Soc.* – 2015. – Vol. 12. – № 5. – P. 752–757.

75. Phillips, M. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath / M. Phillips // *Anal. Biochem.* – 1997. – Vol. 247. – № 2. – P. 272–278.

76. Wang, M. Confounding effect of benign pulmonary diseases in selecting volatile organic compounds as markers of lung cancer / M. Wang, J. Sheng, Q. Wu [et al.] // *J. Breath Res.* – 2018. – Vol. 12. – № 4. – art. 046013.

77. Phillips, M. Blinded validation of breath biomarkers of lung cancer, a potential ancillary to chest CT screening / M. Phillips, T. L. Bauer, R. N. Cataneo [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – № 12. – art. e0142484.

78. Harper, M. Sorbent trapping of volatile organic compounds from air / M. Harper // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – № 885. – P. 129–151.
79. Dettmer, K. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds / K. Dettmer, W. Engewald // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – Vol. 373. – P. 490–500.
80. Pawliszyn, J. Theory of Solid-Phase Microextraction / J. Pawliszyn // *J. of Chromatographic Science.* – 2000. – Vol. 38. – P. 270–278.
81. Garcia, R. A. Volatile Organic Compounds Analysis in Breath Air in Healthy Volunteers and Patients Suffering Epidermoid Laryngeal Carcinomas / R. A. Garcia, V. Morales, S. Martin // *Chromatographia.* – 2014. – Vol 77. – № 5. – P 501–509.
82. Zou, Y. Breath profile as composite biomarkers for lung cancer diagnosis / Y. Zou, Y. Wang, Z. Jiang [et al.] // *Lung Cancer.* – 2021. – Vol. 154. – P. 206–213.
83. Zou, Y. Optimization of volatile markers of lung cancer to exclude interferences of non-malignant disease / Y. Zou, X. Zhang, X. Chen [et al.] // *Cancer Biomark.* – 2014. – Vol. 14. – № 5. – P. 371–379.
84. Jouyban, A. Co-liquefaction with acetone and GC analysis of volatile compounds in exhaled breath as lung cancer biomarkers / A. Jouyban, D. Djozan, P. Mohammadandashti [et al.] // *BioImpacts.* – 2017. – Vol. 7. – № 2. – P. 99–108.
85. Phillips, M. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath / M. Phillips, R. N. Cataneo, A. R. C. Cummin [et al.] // *Chest.* – 2003. – Vol. 123. – № 6. – P. 2115–2123.
86. Phillips, M. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath / M. Phillips, N. Altorki, J. H. Austin [et al.] // *Cancer Biomark.* – 2007. – Vol. 3. – № 2. – P. 95–109.
87. Schallschmidt, K. Comparison of volatile organic compounds from lung cancer patients and healthy controls—Challenges and limitations of an observational study / K. Schallschmidt, R. Becker, C. Jung [et al.] // *J. Breath Res.* – 2016. – Vol. 10. – № 4. – art. 046007.

88. Broza, Y. Y. Nanomaterial-based breath test for short-term follow-up after lung tumor resection / Y. Y. Broza, R. Kremer, U. Tisch [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.* – 2013. – Vol. 9. – № 1. – P. 15–21.

89. Peled, N. Non-invasive breath analysis of pulmonary nodules / N. Peled, M. Hakim, P. A. Bunn [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2012. – Vol. 7. – № 10. – P. 1528–1533.

90. Garcia, R. A. Volatile organic compounds analysis in breath air in healthy volunteers and patients suffering epidermoid laryngeal carcinomas [et al.] / R. A. Garcia, V. Morales, S. Martin [et al.] // *Chromatographia.* – 2014. – Vol. 77. – № 5–6. – P. 501–509.

91. Filipiak, W. Comparative analyses of volatile organic compounds (VOCs) from patients, tumors and transformed cell lines for the validation of lung cancer-derived breath markers / W. Filipiak, A. Filipiak, A. Sponring [et al.] // *J. Breath Res.* – 2014. – Vol. 8. – № 2. – art. 027111.

92. Sutaria, S. Lipid Peroxidation Produces a Diverse Mixture of Saturated and Unsaturated Aldehydes in Exhaled Breath That Can Serve as Biomarkers of Lung Cancer—A Review / S. Sutaria, S. S. Gori, J. D. Morris [et al.] // *Metabolites.* – 2022. – Vol. 12. – art. 561.

93. Svensson, S. Determination of aldehydes in human breath by on-fibre derivatization, solid-phase microextraction and GC–MS / S. Svensson, M. Larstad, K. Broo [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – Vol. 860. – № 1. – P. 86–91.

94. Fu, X. Novel microreactor approach for analysis of ketones and aldehydes in breath / X. Fu, M. Li, S. Biswas [et al.] // *The Analyst.* – 2011. – Vol. 136. – № 22. – P. 4662–4666.

95. Fu, X. Noninvasive detection of lung cancer using exhaled breath / X. Fu, M. Li, R. J. Knipp [et al.] // *Cancer Med.* – 2014. – Vol. 3. – № 1. – P. 174–181.

96. Schumer, E. M. Normalization of Exhaled Carbonyl Compounds After Lung Cancer Resection / E. M. Schumer, M. C. Black, M. Bousamra [et al.] // *Ann. Thorac. Surg.* – 2016. – Vol. 102. – № 4. – P. 1095–1100.

97. Yu, L. Q. A gate-opening controlled metal-organic framework for selective solid-phase microextraction of aldehydes from exhaled breath of lung cancer patients /

L.Q. Yu, L.Y. Wang, F.H. Su [et al.] // *Microchim. Acta.* – 2018. – Vol. 185. – № 6. – art. 307.

98. Wang, W. Laboratory analytical methods applied in the early detection of cancers by tumor biomarker / W. Wang, Y. Yu, X. Zhang [et al.] // *Anal. Methods.* – 2017. – Vol. 9. – № 21. – P. 3085–3093.

99. Wang, P. Identification of lung cancer breath biomarkers based on perioperative breathomics testing: A prospective observational study / P. Wang, Q. Huang, S. Meng // *Eclinicalmedicine.* – 2022. – Vol. 47. – art. 101384.

100. Oort, P. Untargeted molecular analysis of exhaled breath as a diagnostic test for ventilator-associated lower respiratory tract infections (breathdx) / P. Oort, T. M. Nijsen, I. R. White [et al.] // *Thorax.* – 2022. – Vol. 77. – № 1. – 79–81.

101. Phillips, M. Detection of lung cancer using weighted digital analysis of breath biomarkers / M. Phillips, N. Altorki, J. H. M. Austin [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2008. – Vol. 393. – № 2. – P. 76–84.

102. Koureas, M. Target analysis of volatile organic compounds in exhaled breath for lung cancer discrimination from other pulmonary diseases and healthy persons / M. Koureas, P. Kirgou, G. Amoutzias [et al.] // *Metabolites.* – 2020. – Vol. 10. – № 8. – 317.

103. Bajtarevic, A. Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath / A. Bajtarevic, C. Ager, M. Pienz [et al.] // *BMC Cancer.* – 2009. – Vol. 9. – № 8. – art. 348.

104. Westhoff, M. Simultaneous measurement of inhaled air and exhaled breath by double multicapillary column ion-mobility spectrometry, a new method for breath analysis: results of a feasibility study / M. Westhoff, M. Friedrich, J. I. Baumbach // *ERJ Open Res.* – 2022. – Vol. 8. – № 1. – art. 00493-2021.

105. Handa, H. Exhaled breath analysis for lung cancer detection using ion mobility spectrometry / H. Handa, A. Usuba, S. Maddula [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 12. – art. e114555.

106. Pleil, J. D. Advances in proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS): Applications in exhaled breath analysis, food science, and atmospheric chemistry / J. D. Pleil, A. Hansel, J. Beauchamp // *J. Breath Res.* – 2019. – Vol. 13. – № 3. – art. 039002.

107. Spanel, P. Progress in SIFT-MS: Breath analysis and other applications / P. Spanel, D. Smith // *Mass Spectrom. Rev.* – 2011. – Vol. 30. – № 2. – P. 236–267.

108. Hashoul, D. Sensors for detecting pulmonary diseases from exhaled breath / D. Hashoul, H. Haick // *Eur. Respir. Rev.* – 2019. – Vol. 28. – № 152. – art. 190011.

109. Khanmohammadi, A. Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: A Review / A. Khanmohammadi, A. Aghaie, E. Vahedi [et al.] // *Talanta.* – 2020. – Vol. 206. – art. 120251.

110. Shirasu, M. Every breath you take: The value of the electronic nose (e-nose) technology in the early detection of lung cancer / M. Shirasu, K. Touhara // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2018. – Vol. 155. – № 6. – P. 2622–2625.

111. Kabir, K. M. M. Micro- and nanoscale sensing of volatile organic compounds for early-stage cancer diagnosis / K. M. M. Kabir, M. J. Baker, W. A. Donald // *Trends Anal. Chem.* – 2022. – Vol. 153. – art. 116655.

112. Sar, I. G. The smell of lung disease: a review of the current status of electronic nose technology / I. G. Sar, N. Wijbenga, G. Nakshbandi [et al.] // *Respir. Res.* – 2021. – Vol. 22. – art. 246.

113. Scheepers, M. H. M. C. Detection of differentiated thyroid carcinoma in exhaled breath with an electronic nose / M. H. M. C. Scheepers, Z. J. J. Al-Difaie, A. G. W. E. Wintjens // *J. Breath Res.* – 2022. – Vol. 16. – № 3. – art. 036008.

114. Kort, S. Improving lung cancer diagnosis by combining exhaled-breath data and clinical parameters / S. Kort, M. Brusse-Keizer, J. W. Gerritsen [et al.] // *ERJ Open Res.* – 2020. – Vol. 6. – № 1. – art. 00221.

115. Goor, R. Training and validating a portable electronic nose for lung cancer screening / R. Goor, M. Hooren, A. M. Dingemans [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2018. – Vol. 13. – № 5. – P. 676–681.

116. Yu, J.-B. Exhaled Breath Analysis of Lung Cancer Patients Using Metal Oxide Sensor / J.-B. Yu, J.-O. Lim, H.-G. Byun [et al.] // *J. Sens. Sci. Technol.* – 2011. – Vol. 20. – № 5. – P. 281–284.

117. Kononov, A. Online breath analysis using metal oxide semiconductor sensors (electronic nose) for diagnosis of lung cancer / A. Kononov, B. Korotetsky, I. Jahatspanian [et al.] // *J. Breath Res.* – 2019. – Vol. 14. – № 1. – art. 016004.

118. Chang, J. Analysis of volatile organic compounds in exhaled breath for lung cancer diagnosis using a sensor system / J. Chang, D. Lee, S. Ban [et al.] // *Sens. Actuators B: Chem.* – 2018. – Vol. 255. – № 1. – P. 800–807.

119. Kaya, S. I. Recent achievements and challenges on nanomaterial based electrochemical biosensors for the detection of colon and lung cancer biomarkers / S. I. Kaya, G. Ozcelikay, F. Mollarasouli [et al.] // *Sens. Actuators B: Chem.* – 2022. – Vol. 351. – № 15. – art. 130856.

120. Nardi-Agmon, I. Exhaled breath analysis for monitoring response to treatment in advanced lung cancer / I. Nardi-Agmon, M. Abud-Hawa, O. Liran [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2016. – Vol. 11. – № 6. – P. 827–837.

121. Oliveira, L. F. Breath analysis using electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry: A pilot study on bronchial infections in bronchiectasis / L. F. Oliveira, C. Mallafre-Muro, J. Giner [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2022. – Vol. 526. – P. 6–13.

122. Rodriguez-Aguilar, M. Application of chemoresistive gas sensors and chemometric analysis to differentiate the fingerprints of global volatile organic compounds from diseases. Preliminary results of COPD, lung cancer and breast cancer / M. Rodriguez-Aguilar, L. Diaz de Leon-Martinez, P. Gorocica-Rosete [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2021. – Vol. 518. – P. 83–92.

123. Hubers, A. J. Combined sputum hypermethylation and enose analysis for lung cancer diagnosis / A. J. Hubers, P. Brinkman, R. J. Boksem [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 2014. – Vol. 67. – № 8. – P. 707–711.

124. Tirzite, M. Detection of lung cancer with electronic nose and logistic regression analysis / M. Tirzite, M. Bukovskis, G. Strazda [et al.] // *J. Breath Res.* – 2018. – Vol. 13. – № 1. – art. 016006.

125. Natale, C. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors / C. Natale, A. Macagnano, E. Martinelli [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2003. – Vol. 18. – № 10. – P. 1209–1218.

126. D'Amicoa, A. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer / A. D'Amicoa, G. Pennazzab, M. Santonicoa [et al.] // *Lung Cancer*. – 2010. – Vol. 68. – № 2. – P. 170–176.
127. Carneiro, C. C. G. Colorimetric Paper-Based Sensors against Cancer Biomarkers / M. C. C. G. Carneiro, L. R. Rodrigues, F. T. C. Moreira [et al.] // *Sensors* – 2022. – Vol. 22. – art. 3221.
128. Zhong, X. Rapid recognition of volatile organic compounds with colorimetric sensor arrays for lung cancer screening / X. Zhong, D. Li, W. Du [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2018. – Vol. 410. – № 16. – P. 3671–3681.
129. Mazzone, P. J. Exhaled breath analysis with a colorimetric sensor array for the identification and characterization of lung cancer / P. J. Mazzone, X. F. Wang, Y. Xu [et al.] // *J Thorac. Oncol.* – 2012. – Vol. 7. – № 1. – P. 137–142.
130. Li, W. Lung cancer screening based on type-different sensor arrays / W. Li, H. Liu, D. Xie [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – art. 1969.
131. Liu, B. Lung cancer detection via breath by electronic nose enhanced with a sparse group feature selection approach / B. Liu, H. Yu, X. Zeng [et al.] // *Sens. Actuators B: Chem.* – 2021. – Vol. 339. – № 1. – art. 129896.
132. Ligor, M. Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry / M. Ligor, T. Ligor, A. Bajtarevic [et al.] // *J. Clin. Chem. Lab. Med.* – 2009. – Vol. 47. – № 5. – P. 550–560.
133. Corradi, M. Exhaled breath analysis in suspected cases of non-small-cell lung cancer: A cross-sectional study / M. Corradi, D. Poli, I. Banda [et al.] // *J. Breath Res.* – 2015. – Vol. 9. – № 2. – art. 027101.
134. Bousamra, M. Quantitative analysis of exhaled carbonyl compounds distinguishes benign from malignant pulmonary disease / M. Bousamra, E. Schumer, M. Li [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2014. – Vol. 148. – № 3. – P. 1074–1780.
135. Sakumura, Y. Diagnosis by volatile organic compounds in exhaled breath from lung cancer patients using support vector machine algorithm / Y. Sakumura, Y. Koyama, H. Tokutake [et al.] // *Sensors*. – 2017. – Vol. 17. – art. 287.

136. Meng, S. Assessment of an exhaled breath test using high-pressure photon ionization time-of-flight mass spectrometry to detect lung cancer / S. Meng, Q. Li, Z. Zhou [et al.] // *JAMA Netw. Open.* – 2021. – Vol. 4. – № 3. – art. e213486.

137. Westhoff, M. Ion mobility spectrometry for the detection of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer: Results of a pilot study / M. Westhoff, P. Litterst, L. Freitag [et al.] // *Thorax.* – 2009. – Vol. 64. – № 9. – P. 744–748.

138. Lamote, K. Exhaled breath to screen for malignant pleural mesothelioma: A validation study / K. Lamote, M. Vynck, O. Thas [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2017. – Vol. 50. – № 6. – art. 1700919.

139. Wehinger, A. Lung cancer detection by proton transfer reaction mass-spectrometric analysis of human breath gas / A. Wehinger, A. Schmid, S. Mechtcheriakov [et al.] // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2007. – Vol. 265. – P. 49–59.

140. Sun, Y. Analysis of volatile organic compounds from patients and cell lines for the validation of lung cancer biomarkers by proton-transfer-reaction mass spectrometry / Y. Sun, Y. Chen, C. Sun [et al.] // *Anal. Methods.* – 2019. – Vol. 11. – P. 3188–3197.

141. Tirzite, M. Detection of lung cancer in exhaled breath with an electronic nose using support vector machine analysis / M. Tirzite, M. Bukovskis, G. Strazda [et al.] // *J. Breath Res.* – 2017. – Vol. 11. – № 3. – art. 036009.

142. Chang, J. E. Analysis of volatile organic compounds in exhaled breath for lung cancer diagnosis using a sensor system / J. E. Chang, D. S. Lee, S. W. Ban [et al.] // *Sens. Actuators B: Chem.* – 2018. – Vol. 255. – P. 800–807.

143. Binson, V. A. Design and development of an e-nose system for the diagnosis of pulmonary diseases / V. A. Binson, M. Subramoniam // *Acta Bioeng. Biomech.* – 2021. – Vol. 23. – № 1. – P. 35–44.

144. Rocco, R. BIONOTE E-nose technology may reduce false positives in lung cancer screening programmes / R. Rocco, R. A. Incalzi, G. Pennazza [et al.] // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2016. – Vol. 49. – № 4. – P. 1112–1117.

145. Peng, G. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors / G. Peng, M. Hakim, Y. Y. Broza [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 103. – № 4. – P. 542–551.

146. Mazzone, P. J. Diagnosis of lung cancer by the analysis of exhaled breath with a colorimetric sensor array / P. J. Mazzone, J. Hammel, R. Dweik [et al.] // *Thorax.* – 2007. – Vol. 62. – № 7. – P. 565–568.

147. Kort, S. Multi-centre prospective study on diagnosing subtypes of lung cancer by exhaled-breath analysis / S. Kort, M. M. Tiggeloven, M. Brusse-Keizer [et al.] // *Lung Cancer.* – 2018. – Vol. 125. – P. 223–229.

148. Chen, X. A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis / X. Chen, F. Xu, Y. Wang [et al.] // *Cancer.* – 2007. – Vol. 110. – № 4. – P. 835–844.

149. Bianchi, F. Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry followed by multivariate data analysis for the identification of volatile organic compounds as possible biomarkers in lung cancer tissues / F. Bianchi, N. Riboni, P. Carbognani [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2017. – Vol. 146. – P. 329–333.

150. Barash, J. Classification of lung cancer histology by gold nanoparticle sensors / J. Barash, N. Peled, U. Tisch [et al.] // *Nanomedicine.* – 2012. – Vol. 8. – № 5. – P. 580–589.

151. Yao, M. “Smoke Detector” of Human Diseases for Environmental Aerosol Exposure / M. Yao // *Chin. J. Chem.* – 2022. – Vol. 40. – № 12. – P. 1471–1477.

152. Dragonieri, S. Short-Term Effect of Cigarette Smoke on Exhaled Volatile Organic Compounds Profile Analyzed by an Electronic Nose / S. Dragonieri, V. N. Quaranta, E. Buonamico // *Biosensors.* – 2022. – Vol. 12. – art. 520.

153. Buszewski, B. Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry / B. Buszewski, A. Ulanowska, T. Ligor [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 2008. – Vol. 23. – P. 551–556.

154. Filipiak, W. Dependence of exhaled breath composition on exogenous factors smoking habits and exposure to air pollutants / W. Filipiak, V. Ruzsanyi, P. Mochalski [et al.] // *J. Breath Res.* – 2012. – Vol. 6. – № 3. – art. 036008.

155. Chen, X. Association of smoking with metabolic volatile organic compounds in exhaled breath / X. Chen, F. Wang, L. Lin [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – № 11. – art. 2235.

156. Papaefstathiou, E. Breath analysis of smokers, non-smokers, and e-cigarette users / E. Papaefstathiou, M. Stylianou, C. Andreou [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2020. – Vol. 1160. – art. 122349.

157. Blanchet, L. Factors that influence the volatile organic compound content in human breath / L. Blanchet, A. Smolinska, A. Baranska [et al.] // *J. Breath Res.* – 2017. – Vol. 11. – № 1. – art. 016013.

158. Spanel, P. Breath acetone concentration; biological variability and the influence of diet / P. Spanel, K. Dryahina, A. Rejskova [et al.] // *Physiol. Meas.* – 2011. – Vol. 32. – № 8. – art. N23.

159. Smith, D. Trace gases in breath of healthy volunteers when fasting and after a protein-calorie meal: a preliminary study / D. Smith, P. Spanel, S. Davies // *J Appl. Physiol.* – 1999. – Vol. 87. – № 5. – P. 1584–1588.

160. Raninen, K. J. Fiber content of diet affects exhaled breath volatiles in fasting and postprandial state in a pilot crossover study / K. J. Raninen, J. E. Lappi, M. L. Mikkala [et al.] // *Nutr. Res.* – 2016. – Vol. 36. – № 6. – P. 612–619.

161. Aghdassi, E. Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions / E. Aghdassi, J. P. Allard // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – Vol. 28. – № 6. – P. 880–886.

162. Phillips, M. Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress / M. Phillips, R. N. Cataneo, J. Greenberg [et al.] // *J. Lab. Clin. Med.* – 2000. – Vol. 136. – № 3. – P. 243–249.

163. Lechner, M. Gender and age specific differences in exhaled isoprene levels / M. Lechner, B. Moser, D. Niederseer [et al.] // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2006. – Vol. 154. – № 3. – P. 478–483.

164. Sukul, P. Physiological and metabolic effects of healthy female aging on exhaled breath biomarkers / P. Sukul, S. Grzegorzewski, C. Broderius [et al.] // *iScience*. – 2022. – Vol. 25. – № 2. – art. 103739.

165. Shaffie, A. Lung Cancer Diagnosis System Based on Volatile Organic Compounds (VOCs) Profile Measured in Exhaled Breath / A. Shaffie, A. Soliman, A. Eledkawy // *Appl. Sci.* – 2022. – Vol. 12. – art. 7615.

166. Гашимова, Э. М. Летучие органические соединения из выдыхаемого воздуха как биомаркеры рака легких. Достижения и возможные проблемы / Э. М. Гашимова, А. З. Темердашев, В. А. Порханов [и др.] // *Журн. аналит. химии*. – 2022. – Т. 77. – № 7. – С. 585–615.

167. Smith, D. Pitfalls in the analysis of volatile breath biomarkers: suggested solutions and SIFT-MS quantification of single metabolites / D. Smith, P. Spanel // – 2015. – Vol. 9. – № 2. – art. 022001.

168. Jia, Z. Critical review of volatile organic compound analysis in breath and in vitro cell culture for detection of lung cancer / Z. Jia, A. Patra, V. K. Kutty [et al.] // *Metabolites*. – 2019. – Vol. 9. – № 3. – art. 52.

169. Гашимова, Э. М. Оценка возможности газохроматографического определения летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе для неинвазивной диагностики рака легких / Э. М. Гашимова, А. З. Темердашев, В. А. Порханов [и др.] // *Журн. аналит. химии*. – 2019. – Т. 74. – №5. – С. 365–372.

170. Кучменко, Т. А. Применение «электронного носа» на пьезосенсорах для сканирования летучих соединений гинекологических проб / Т. А. Кучменко, Е. С. Доровская, Ю. Н. Босикова [и др.] // *Журн. аналит. химии*. – 2021. – Т. 76. – № 7. – С. 634–647.

171. Кучменко, Т. А. Применение пьезоэлектронного носа для оценки состояния дыхательной системы у телят по легколетучим соединениям / Т. А. Кучменко, А. А. Шуба, Р. У. Умарханов [и др.] // *Журн. Аналит. Химии*. – 2020. – Т. 75. – №5. – С. 449–457.

172. Кучменко, Т. А. Разработка способа оценки активности *helicobacter pylori* по составу выдыхаемого воздуха с применением массива химических

пьезосенсоров / Т. А. Кучменко, А. А. Шуба, Д. А. Кучменко [и др.] // Журн. Аналит. Химии. – 2020. – Т. 75. – № 4. – С. 368–378.

173. Кучменко, Т. А. Пример решения идентификационных задач в методе пьезокварцевого микровзвешивания смесей некоторых органических соединений / Т. А. Кучменко, А. А. Шуба, Н. В. Бельских [и др.] // Аналитика и контроль. – 2012. – № 2. – С. 151–161.

174. Gashimova, E. Exhaled breath analysis using GC-MS and an electronic nose for lung cancer diagnostics / E. Gashimova, A. Osipova, A. Temerdashev [et al.] // Anal Methods. – 2021. – Vol. 13. – № 40. – P. 4793–4804.

175. Ahmadipour, M. Detection of breath acetone by semiconductor metal oxide nanostructures-based gas sensors: A review / M. Ahmadipour, A. L. Pang, M. R. Ardani [et al.] // Mater. Sci. Semicond. Process. – 2022. – Vol. 149. – art. 106897.

176. Abbott, S. M. Quantification of acetonitrile in exhaled breath and urinary headspace using selected ion flow tube mass spectrometry / S. M. Abbott, J. B. Elder, P. Spanel [et al.] // Int. J. Mass Spectrom. – 2003. – Vol. 228. – P. 655–665.

177. Ligor, T. Preliminary study of volatile organic compounds from breath and stomach tissue by means of solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry / T. Ligor, J. Szeliga, M. Jackowski [et al.] // J. Breath Res. – 2007. – Vol. 1. – № 1. – art. 016001.

178. Andre, L. Porous materials applied to biomarker sensing in exhaled breath for monitoring and detecting non-invasive pathologies / L. Andre, N. Desbois, C. P. Gros [et al.] // Dalton Trans. – 2020. – Vol. 49. – № 43. – P. 15161–15170.

179. Soltanpour, Z. The exposure to formaldehyde in industries and health care centers: A systematic review and probabilistic health risk assessment / Z. Soltanpour, Y. Mohammadian, Y. Fakhri // Environ Res. – 2022. – Vol. 204. – art. 112094.

180. Bernardini, L. Formaldehyde toxicity reports from in vitro and in vivo studies: a review and updated data / L. Bernardini, E. Barbosa, M. F. Charao [et al.] // Drug Chem Toxicol. – 2020. – Vol. 45. – № 3. – P. 972–984.

181. Liu, N. Health effects of exposure to indoor volatile organic compounds from 1980 to 2017: A systematic review and meta-analysis / N. Liu, Z. Bu, W. Liu [et al.] // – 2022. – Vol. 32. – № 5. – art. e13038.

182. Tsai, J. H. The speciation of volatile organic compounds (VOCs) from motorcycle engine exhaust at different driving modes / J. H. Tsai, H. L. Chiang, Y. C. Hsu [et al.] // Atmos. Environ. – 2003. – Vol 37. – № 18. – P. 2485–2496.

183. Yue, T. Characteristics of volatile organic compounds (VOCs) from the evaporative emissions of modern passenger cars / T. Yue, X. Yue, F. Chai [et al.] // Atmospheric Environment – 2017. – Vol 151. – P. 62–69.

184. Monod, A. Monoaromatic compounds in ambient air of various cities: a focus on correlations between the xylenes and ethylbenzene / A. Monod, B. C. Sive, P. Avino [et al.] // Atmos. Environ. – 2001. – Vol 35. – P. 135–149.

185. Bibeau, L. Treatment of Air Polluted with Xylenes using a Biofilter Reactor / L. Bibeau, K. Kiared, R. Brzezinski [et al.] // Wat. Air and Soil Poll. – 2000. – Vol 118. – № 3. – P. 377–393.

186. Davidson, C. J. A novel preclinical model of environment-like combined benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) exposure: Behavioral and neurochemical findings / C. J. Davidson, D. W. Svenson. J. H. Hannigan [et al.] // Neurotoxicol. Teratol. – 2022. – Vol 91. – P. 107076.

187. Vartiainen, E. Formation and growth of indoor air aerosol particles as a result of D-limonene oxidation / E. Vartiainen, M. Kulmala, T. M. Ruuskanen // Atmos. Environ. – 2006. – Vol 40. – P. 7882–7892.

188. Gashimova, E. Investigation of different approaches for exhaled breath and tumor tissue analyses to identify lung cancer biomarkers / E. Gashimova, A. Temerdashev, V. Porkhanov [et al.] // Helyion. – 2020. – Vol. 6. – № 6. – art. e04224.

189. Smith, D. Online, simultaneous quantification of ethanol, some metabolites and water vapour in breath following the ingestion of alcohol / D. Smith W. Tianshu, P. Spanel // Physiol Meas. – 2002. – Vol 23. – № 3. – P. 477–489.

190. Chen, M. L. Relationship between environmental exposure to toluene, xylene and ethylbenzene and the expired breath concentrations for gasoline service workers / M.

L. Chen, S. H. Chen, B. R. Guo [et al.] // *Journal of Environmental Monitoring* – 2002. – Vol 4. – № 4. – P. 562–566.

191. Mayer, A. C. Characterizing exposure to benzene, toluene, and naphthalene in firefighters wearing different types of new or laundered PPE / A. C. Mayer, K. W. Fent, A. Wilkinson [et al.] // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* – 2022. – Vol 240. – art. 113900.

192. Kalidoss, R. An investigation of GO-SnO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> ternary nanocomposite for the detection of acetone in diabetes mellitus patient's breath / R. Kalidoss, S. Umapathy, Y. Sivalingamb // *Appl. Surf. Sci.* – 2019. – Vol 449.– P. 667–684.

193. Kischkel, S. Breath biomarkers for lung cancer detection and assessment of smoking related effects – Confounding variables, influence of normalization and statistical algorithms / S. Kischkel, W. Miekisch, A. Sawacki [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2010. – Vol 411.– P. 1637–1644.

194. Gashimova, E. Study of confounding factors influence on lung cancer diagnostics effectiveness using gas chromatography–mass spectrometry analysis of exhaled breath / E. Gashimova, A. Osipova, A. Temerdashev [et al.] // *Biomark. Med.* – 2021. – Vol 15. – № 11. – P. 821–829.

195. Акопов, А. Современные подходы к классификации рака легкого / А.Акопов // *Врач.* – 2011. – № 12. – С. 7–12.

196. Гашимова, Э. М. Оценка возможности дифференцирования гистологического типа и локализации опухоли у пациентов с раком легких по составу выдыхаемого воздуха / Э. М. Гашимова, А. З. Темердашев, В. А. Порханов [и др.] // *Журн. аналит. химии.* – 2021. – Т. 76. – №8. – С. 723–729.

197. Гашимова, Э. М. Сравнительная характеристика до и послеоперационных профилей летучих органических соединений из выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и пациентов с доброкачественными опухолями / Э. М. Гашимова, А. З. Темердашев, В. А. Порханов [и др.] // *Журн. аналит. химии.* – 2022. – Т. 77. – №12.

198. Capone, S. Chromatographic analysis of VOC patterns in exhaled breath from smokers and nonsmokers / S. Capone, M. Tufariello, A. Forleo [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 2017. – Vol. 32. – № 4. – art. e4132.

199. Papaefstathiou, E. Breath analysis of smokers, non-smokers, and e-cigarette users / E. Papaefstathiou, M. Stylianos, C. Andreou [et al.] // J. Chromatogr. B – 2020. – Vol. 1160. – № 4. – art. 122349.

200. Gaida, A. A dual center study to compare breath volatile organic compounds from smokers and non-smokers with and without COPD / A. Gaida, O. Holz, C. Nell [et al.] // J. Breath Res. – 2016. – Vol. 10. – № 2. – art. 026006.

201. Свидетельство: 2021662555. Прогнозирование рака легких методом нейронных сетей: программа для ЭВМ / Э. М. Гашимова, А. З. Темердашев, В. А. Порханов, И. С. Поляков, Д. В. Перунов (RU); правообладатель ФГБОУ ВО КубГУ. № 2021661638; Заявл. 22.07.2021., опубл. 30.07.2021, 351 КБ.