

УДК 543.641+543.544.43+543.51

## СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА РАСТВОРА СИЛИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ВЫСУШЕННЫХ ОБРАЗЦОВ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, ХОБЛ И ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2022 г. А. И. Ревельский<sup>а</sup>, \*, А. С. Самохин<sup>а</sup>, Э. Х. Анаев<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет  
Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

<sup>б</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова  
ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия

\*e-mail: sorbent@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.01.2022 г.

После доработки 17.02.2022 г.

Принята к публикации 10.03.2022 г.

Конденсату выдыхаемого воздуха (КВВ) как объекту анализа в метаболомных исследованиях по-прежнему уделяется внимание аналитиков. Конденсат выдыхаемого воздуха – это образец, состав которого отражает особенности биохимических процессов в организме, является относительно чистой, по сравнению с кровью, матрицей, в отличие от выдыхаемого воздуха содержит больше полярных компонентов (в том числе нелетучих). Кроме того, пробоотбор КВВ является неинвазивным. Методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии с электронной ионизацией изучены продукты силилирования лиофилизатов образцов КВВ здоровых волонтеров и больных бронхиальной астмой (БА), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). На хроматограммах по полному ионному току, соответствующих образцам больных БА и ХОБЛ, зарегистрированы силильные производные моно-D-фруктозы и дисахаридов. Выдвинуто предположение о том, что D-фруктоза может быть маркером особенностей биохимических процессов, происходящих в организме пациентов с диагнозами БА и ХОБЛ.

**Ключевые слова:** конденсат выдыхаемого воздуха, лиофилизация, силилирование, N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА), газовая хроматография-масс-спектрометрия, биомаркеры, бронхиальная астма (БА), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), D-фруктоза, моносахариды, дисахариды.

DOI: 10.31857/S0044450222110093

Современные исследования в области метаболомного анализа образцов конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) при респираторных заболеваниях направлены [1] на оценку профилей биомаркеров и создание “отпечатков пальцев” заболевания; на идентификацию специфических метаболитов, характеризующих заболевание; на распознавание конкретных заболеваний и их фенотипирование; на выявление возможных метаболитических путей, в том числе с помощью специального программного обеспечения (например, MetaboAnalyst 3.0 [2]).

При сравнении групп здоровых добровольцев и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмой (БА) часто используют метод ЯМР и различные варианты сочетания хроматографии и масс-спектро-

метрии, в том числе газовой хроматографии-масс-спектрометрии [3].

В метаболомике на основе масс-спектрометрии развиваются нецелевой и целевой анализы. В случае нецелевого анализа исследователи пытаются оценить весь молекулярный (компонентный) состав образцов, чтобы охватить максимальное количество веществ, потенциально отвечающих за особенности физиологических и патологических биохимических процессов. Целевой анализ направлен на обнаружение и определение конкретных метаболитов/классов метаболитов, теоретически (или доказанно) связанным с биологическими механизмами, ответственными за патологию. При этом часто теряется информация о новых (или не рассматриваемых в данном анализе) биомаркерах заболеваний [4]. Это осо-

бенно заметно, если анализ не ретроспективен, например, нет данных, собранных в режиме сканирования полного ионного тока в правильно выбранном диапазоне а.е.м..

Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) обоснованно используют при задачах обнаружения низкомолекулярных органических соединений, как летучих, так и нелетучих (после предварительной дериватизации [5]), причем на уровне следов. В обзоре [5] обращено внимание на обнаружение в образцах КВВ при ХОБЛ и БА низкомолекулярных органических соединений.

В образцах КВВ здоровых добровольцев с применением в качестве способа пробоподготовки твердофазной микроэкстракции (и из паровой фазы над образцом, и непосредственно из жидкой фазы КВВ) обнаружили нормальные и разветвленные углеводороды, спирты, кетоны, альдегиды, карбоновые кислоты [6].

В конденсате выдыхаемого воздуха при астме, по сравнению с образцами здоровых волонтеров, наблюдают повышенные содержания маркера окислительного стресса 8-изопростана, стабильного продукта пероксидного окисления липидов. Определяли производные 8-изопростана методом ГХ-МС с химической ионизацией и регистрацией отрицательных ионов [7].

Другими маркерами окислительного стресса при астме, определяемыми в КВВ, являются малоновый диальдегид, 4-гидроксигексеналь, 4-гидроксиноненаль и насыщенные альдегиды (гексаналь, гептаналь и нонаналь) [8]. Эти же маркеры, за исключением 4-гидроксигексаналя, 4-гидроксиноненала, определяли при ХОБЛ [9]. Медиатор воспалительного процесса – лейкотриен В<sub>4</sub> – определяют в КВВ как больных БА, так и ХОБЛ [10]. К маркерам окислительного стресса относят также тирозин и нитротирозин [11]. Уровень карбоксиметиллизина в КВВ больных БА значительно ниже, чем в образцах КВВ здоровых добровольцев [12].

Жидкостно-жидкостная экстракция среднелетучих органических веществ (из образцов КВВ здоровых волонтеров, больных ХОБЛ и БА) с последующим вводом больших по объему проб в ГХ-МС позволила обнаружить ряд жирных кислот, спирты, альдегиды, в том числе с подтверждением по образцам сравнения [13].

С применением в качестве способа пробоподготовки лиофилизации методом ВЭЖХ определяли аденозин в образцах КВВ больных астмой [14]. Определение концентрации аденозина в образцах КВВ больных ХОБЛ и БА позволило оценить активность воспалительного процесса в бронхолегочной системе и эффективность терапии у пациентов [15].

При мониторинге общего воспаления или воспаления дыхательных путей при респираторных заболеваниях в образцах КВВ астматиков фиксируют повышение в разы (по сравнению с образцами здоровых людей) концентрации 3-нитротирозина. Производные аналита определяют методом ГХ-МС [16].

Из моносахаридов, изменение содержания которых в биологических жидкостях фиксируется при ХОБЛ и БА, можно отметить сиаловые кислоты. Повышение суммарного содержания сиаловых кислот в сыворотке крови пациента с ХОБЛ отражает наличие воспалительных процессов при данном заболевании [17, 18]. Литературные данные, отражающие информацию о содержании этих кислот в КВВ при ХОБЛ и БА, не обнаружены.

Средняя концентрация глюкозы в жидкости, выстилающей дыхательные пути здорового человека, составляет 0.4 мМ. Это примерно в 12 раз ниже, чем средняя концентрация глюкозы в его крови (4.8 мМ) [19]. Из-за высокого градиента концентрации между кровью и жидкостью дыхательных путей предполагают, что перенос глюкозы между этими биологическими жидкостями и установление соответствующего равновесия происходит быстро, что может быть использовано для неинвазивного определения уровня глюкозы, в частности, при анализе конденсата выдыхаемого воздуха [20].

Нарушения метаболизма глюкозы чаще встречаются у пациентов с ХОБЛ, чем у людей, не страдающих этим заболеванием [21, 22]. У обследованных пациентов с обострением ХОБЛ повышенные уровни глюкозы в крови связывали именно с этим диагнозом [23].

В исследованиях, посвященных анализу не КВВ, а образцов других биологических жидкостей дыхательных путей (назальный смыв, мокрота, раствор бронхоальвеолярного лаважа) у пациентов с ХОБЛ, концентрация глюкозы была повышена по сравнению со здоровыми добровольцами [19].

При анализе КВВ, отобранного при других заболеваниях (диабет, муковисцидоз), зафиксировано повышение содержания глюкозы [19], при этом публикации, в которых отражены исследования содержания глюкозы в КВВ больных ХОБЛ и БА, отсутствуют.

Цель данной работы – исследование растворов сильных производных компонентов высушенных образцов КВВ больных БА, ХОБЛ и здоровых добровольцев методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии для обнаружения потенциальных низкомолекулярных биомаркеров заболевания.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы КВВ для исследования отбирали с помощью установки ECoScreen (Jaeger, Würzburg, Германия). Благодаря системе клапанов на пути движения вдыхаемого воздуха из окружающей среды и выдыхаемого воздуха в охлаждающее устройство эти потоки не смешивались, и образующаяся слюна не попадала в КВВ. Пациент, сидя, вдыхал и выдыхал воздух через рот при спокойном дыхании (для исключения прохождения воздуха через носовую полость использовали носовой зажим).

В группу здоровых отбирали добровольцев с нормальными показателями функции легких, у которых в анамнезе отсутствовали указания на астению, хронические заболевания легких, других органов и систем, а также острые респираторные симптомы в течении последних двух месяцев. В группу пациентов с ХОБЛ входили больные с ранее подтвержденным диагнозом ХОБЛ 2 и 3 степени [24], в группу пациентов с бронхиальной астмой входили больные с ранее подтвержденным диагнозом БА в соответствии с рекомендациями GINA [24]. Больные, принимающие системные глюкокортикостероиды, страдающие другими болезнями легких, онкологическими заболеваниями, имеющие тяжелую сопутствующую патологию сердечно-сосудистой системы, органов пищеварения, мочеполовой и нервной системы, сахарный диабет, злоупотребляющие алкоголем и наркотиками в анамнезе в исследование не включали.

Пробоотбор осуществляли в течение 10 мин. Было отобрано 5 образцов КВВ больных БА, 13 образцов КВВ больных ХОБЛ, 2 образца КВВ спортсменов после нагрузки, 5 образцов КВВ здоровых добровольцев (по одному образцу у каждого человека). Собранные образцы КВВ переливали в стеклянные вials объемом 1.5 мл или полипропиленовые пробирки. Далее образцы замораживали для хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Аликвоты размороженных образцов (образцы не перезамораживали) объемом 0.5–1.0 мл лиофилизировали. К высушенному остатку добавляли 50 мкл N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БСТФА), вials с полученными растворами выдерживали при  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин в термостате. Растворы остужали до комнатной температуры и пробу объемом 1 мкл вводили в инжектор газового хроматографа Thermo Scientific Finnigan TRACE GC Ultra (Италия), соединенного с масс-спектрометром Trace DCQ MS, в режиме с делением/без деления потока. Температура инжектора составляла  $250^{\circ}\text{C}$ . Диапазон времени от момента ввода пробы до открытия клапана делителя потока 30 с. Вещества разделяли в кварцевой капиллярной ко-

лонке Restek Rtx-5MS. Длина колонки – 15 м, внутренний диаметр – 0.25 мм. Толщина неподвижной фазы – 0.25 мкм. Поток гелия через колонку  $1\text{ см}^3/\text{мин}$ . Сконцентрированные на входе в аналитическую колонку компоненты разделяли в условиях программирования температуры термостата, их масс-спектры электронной ионизации с энергией 70 eV регистрировали в режиме полного ионного тока. Термостат колонок нагревали по следующей программе: изотерма  $50^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин, далее нагрев со скоростью  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $250^{\circ}\text{C}$  и выдерживание при этой температуре в течение 10 мин. Температура обогреваемого интерфейса между газовым хроматографом и масс-спектрометром  $250^{\circ}\text{C}$ . Диапазон сканирования выбрали от 50 до 700 а.е.м.. Полученные хроматограммы сравнивали между собой. Масс-спектры обнаруженных компонентов сравнивали с библиотечными (NIST).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании предполагали обнаружить неизвестные низкомолекулярные органические вещества – потенциальные маркеры БА и ХОБЛ методом ГХ-МС. Необходимо было выбрать способ пробоподготовки, обеспечивающий возможность обнаружения среднетелучих органических веществ и термостабильных продуктов дериватизации нелетучих низкомолекулярных органических веществ в одинаковых условиях хроматографического разделения на следовом уровне. Лиофилизация образцов с последующим силилированием позволяет решить такую задачу.

Примеры хроматограмм, соответствующих образцам КВВ здорового добровольца, больного БА, больного ХОБЛ, спортсмена после нагрузки представлены на рис. 1–4 соответственно. Сравнение полученных хроматограмм выявило заметные различия между образцами. На хроматограммах по полному ионному току всех образцов КВВ больных БА и ХОБЛ обнаружены две группы хроматографических пиков в диапазонах времен удерживания 12.0–12.2 мин и 15.2–16.0 мин. На хроматограммах спортсменов обнаружены пики только в диапазоне 15.2–16.0 мин. На хроматограммах образцов КВВ здоровых добровольцев пиков в этих диапазонах времен удерживания не обнаружено (или они ниже пределов обнаружения). Сравнив масс-спектры, соответствующие хроматографическим пикам в диапазоне времен удерживания 15.2–16.0 мин, с библиотечными и обратив внимание на характеристические значения  $m/z$  в этих спектрах, можно с высокой долей вероятности считать, что речь идет о смеси силильных производных дисахаридов (в том числе, возможно, и сахарозы). На данном этапе исследования

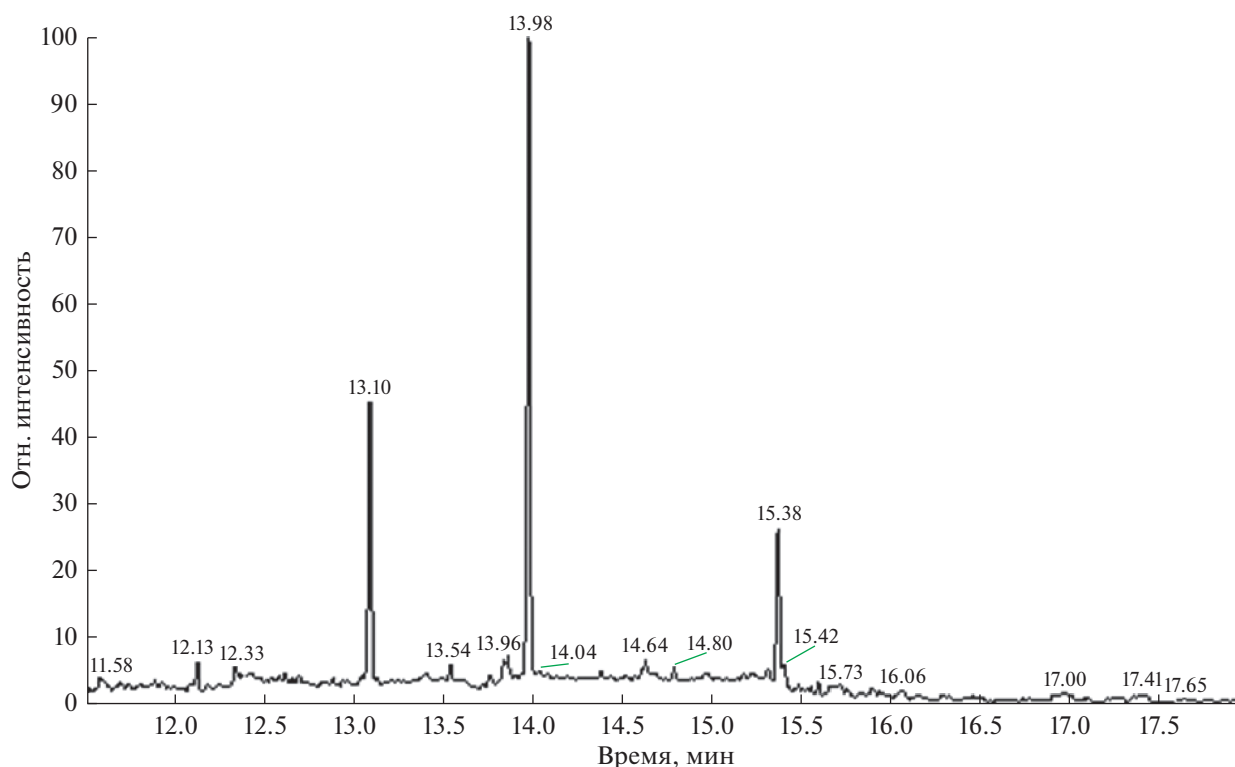


Рис. 1. Хроматограмма продуктов силилирования высушенного образца конденсата выдыхаемого воздуха здорового добровольца.

мы не уделили большего внимания этой группе соединений, хотя эти вещества, безусловно, представляют интерес для выяснения особенностей метаболизма у рассмотренных групп людей. Особое внимание привлекли хроматографические пики с временами удерживания 12.03 и 12.07 мин, зарегистрированные только на хроматограммах силильных производных высушенных образцов КВВ больных астмой и ХОБЛ в диапазоне времен удерживания 12.0–12.2 мин. Сравнение соответствующих масс-спектров со спектрами библиотеки NIST, соотношение характеристических ионов в масс-спектрах позволило выдвинуть предположение, что эти хроматографические пики соответствуют силильным производным фуранозной и пиранозной форм D-фруктозы. На рис. 5 представлен масс-спектр электронной ионизации, соответствующий хроматографическому пику со временем удерживания 12.07 мин (масс-спектры обоих хроматографических пиков очень похожи), на схеме 1 – структурная формула вещества (силилового эфира D-фруктозы) из масс-спектральной базы данных. Библиотечные масс-спектры силильных производных глюкозы заметно отличаются от масс-спектров зарегистрированного соединения. Хроматографические пики производных глюкозы не были зарегистрированы.

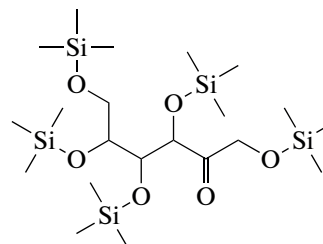
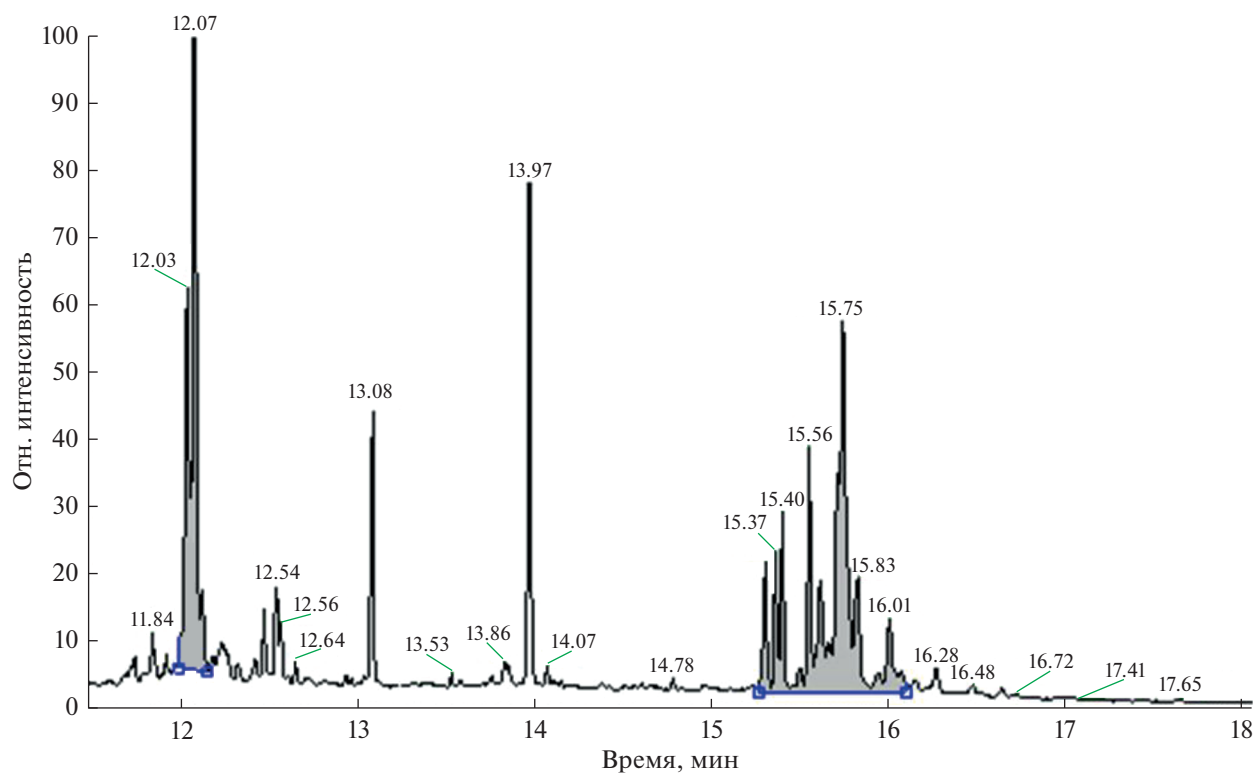
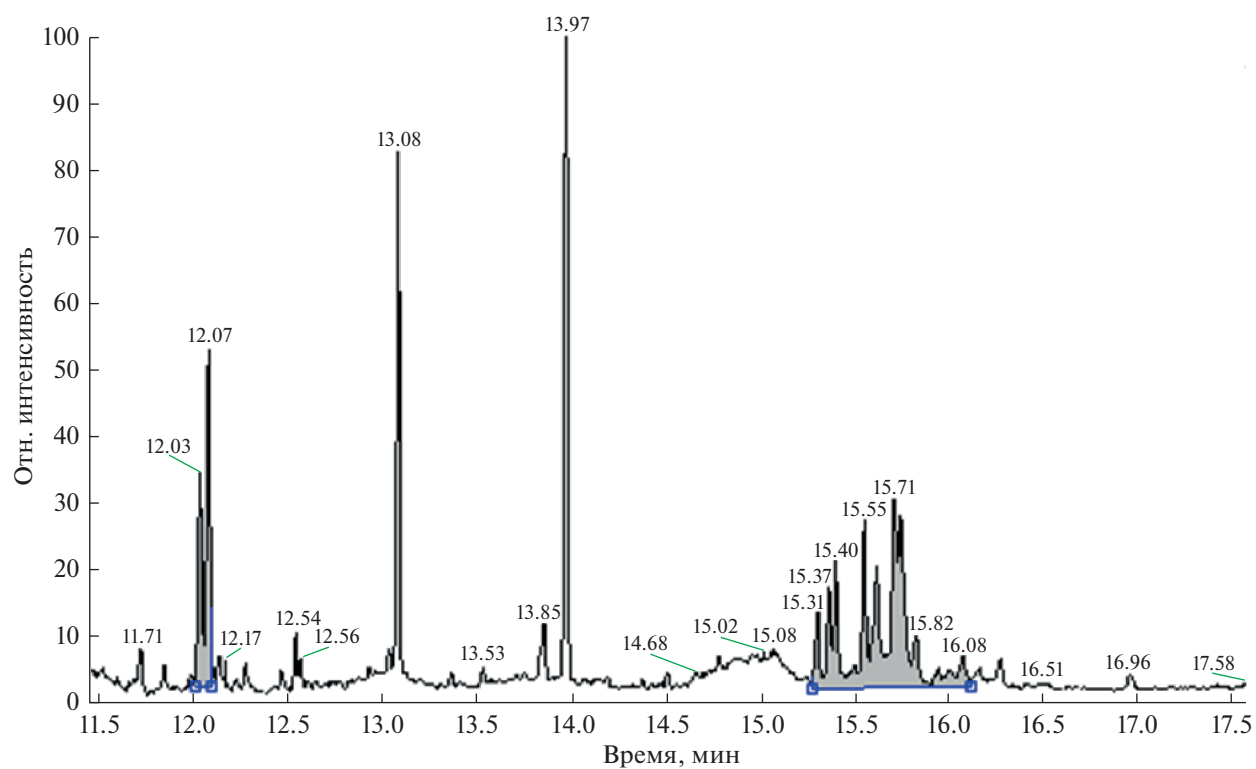


Схема 1. Структурная формула вещества из базы данных масс-спектров NIST, масс-спектр которого с высокой степенью сходимости совпал с масс-спектрами веществ с временами удерживания 12.03 и 12.07 мин (D-fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-C<sub>21</sub>H<sub>52</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>5</sub>, MW 540, CAS#19126-98-8).

Далее провели поиск литературы по списку ключевых слов, включающих “exhaled breath condensate”, “fructose”, “COPD/astma”. Не удалось обнаружить публикации, в которых фруктозу как продукт метаболических процессов в организме человека идентифицировали бы в КВВ при ХОБЛ или БА. Однако выявили две публикации, в которых фруктоза в той или иной форме фигурирует в роли биомаркера ХОБЛ [25, 26]. Авторы работы [25] сравнили составы образцов плазмы крови двух групп пациентов с диагнозом ХОБЛ (выживших и умерших в течение двух лет после исследования). Оказалось, что в ограниченный круг компонентов, внесших наибольший вклад в различие таких групп образцов, входит фруктоза (замет-



**Рис. 2.** Хроматограмма продуктов силилирования высушенного образца конденсата выдыхаемого воздуха пациента с диагнозом бронхиальная астма.



**Рис. 3.** Хроматограмма продуктов силилирования высушенного образца конденсата выдыхаемого воздуха пациента с диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ).

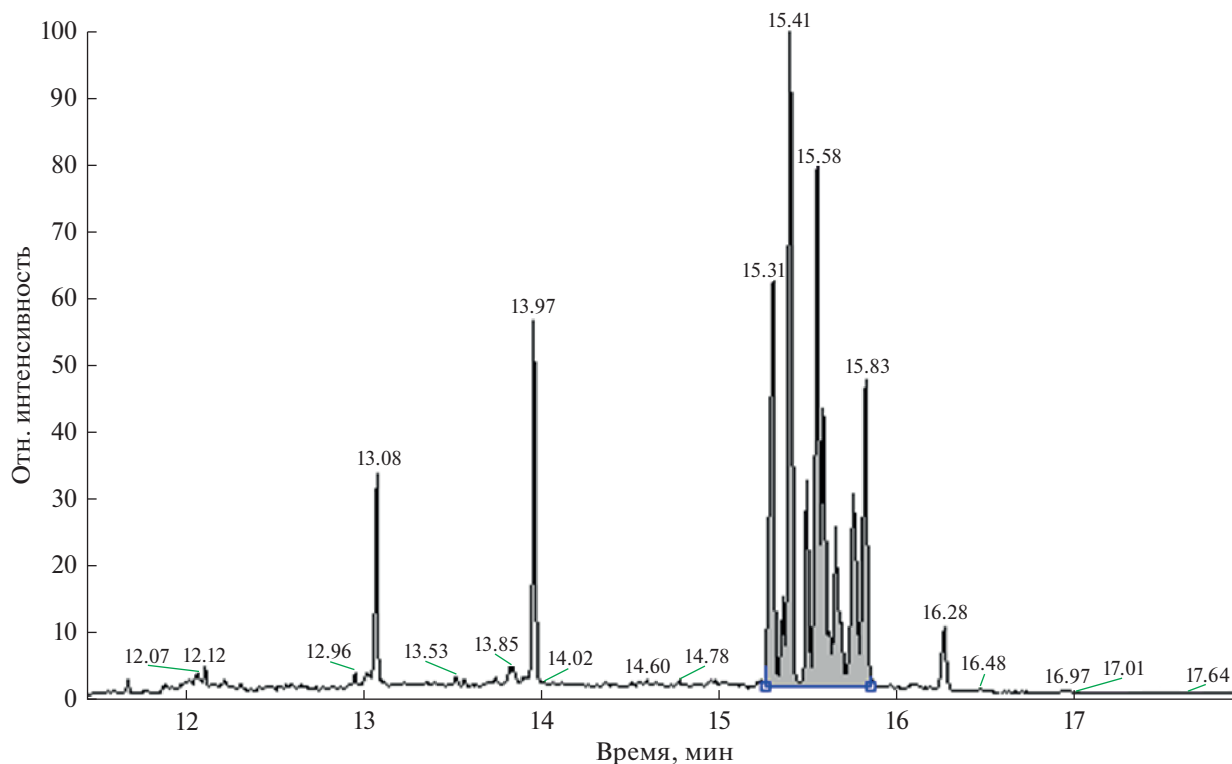


Рис. 4. Хроматограмма продуктов силилирования высушенного образца конденсата выдыхаемого воздуха спортсмена (образец отобран после физической нагрузки).

ный рост содержания этого вещества в образцах плазмы крови умерших пациентов). В этот же круг веществ вошел и лактат, являющийся известным маркером ХОБЛ [27].

При выяснении влияния нарушения мышечного метаболизма на переносимость физических нагрузок при ХОБЛ сравнили содержания веществ в образцах ткани (латеральной широкой мышцы бедра) пациентов с ХОБЛ и здоровых волонтеров того же возраста (отобраны биопсией), расходующихся и образующихся при гликолизе [26]. Анализ экстрактов из образцов ткани методом ВЭЖХ показал, что индуцированное физической нагрузкой образование конечных продуктов гликолиза, таких как лактат и пируват, и промежуточных продуктов гликолиза, таких как глюкозо-6-фосфат, глюкозо-1-фосфат и фруктозо-6-фосфат, а также потребление гликогена выше у пациентов с ХОБЛ. Вероятно, что такое нарушение мышечного метаболизма при нагрузке у больных ХОБЛ (выраженное в том числе повышенным содержанием фруктозо-6-фосфата в мышцах) взаимосвязано с появлением фруктозы в КВВ, обнаруженной в нашем исследовании.

В результате проведенного нами исследования в образцах КВВ пациентов с диагнозами БА и ХОБЛ обнаружены вещества (фруктоза, дисахариды), которые отсутствуют в образцах здоровых добровольцев. Данные о наличии таких веществ в КВВ больных БА и ХОБЛ не представлены в ли-

тературе. Выбранные условия пробоподготовки (лиофилизация и силилирование) и анализа позволили зарегистрировать производные этих потенциальных маркеров заболеваний на хроматограммах по полному ионному току. Это, в свою очередь, позволило провести качественное сравнение (в масс-спектрах веществ видны все или большинство фрагментных ионов) с библиотечными данными (NIST).

Важно отметить, что потенциальные маркеры обнаружены в каждом из 18 образцов больных (5 пациентов с БА, 13 пациентов с ХОБЛ).

Далеко не всегда удается выделить новое вещество, характеризующее особенности биохимических процессов при заболевании и отсутствующее в образцах здоровых добровольцев. Часто содержание вещества-маркера в биологической жидкости больного только повышено/понижено по сравнению с образцом здорового добровольца. Обычно для выявления потенциальных биомаркеров заболевания приходится сравнивать большое количество (часто более 50 на каждую группу) образцов биологических жидкостей здоровых и больных пациентов с последующей математической обработкой полученных данных с введением различных поправок на матричный эффект, на различие концентраций одних и тех же аналитов у разных людей, связанное с естественным разбавлением исследуемых биологических жидкостей. В результате нашего исследования на за-

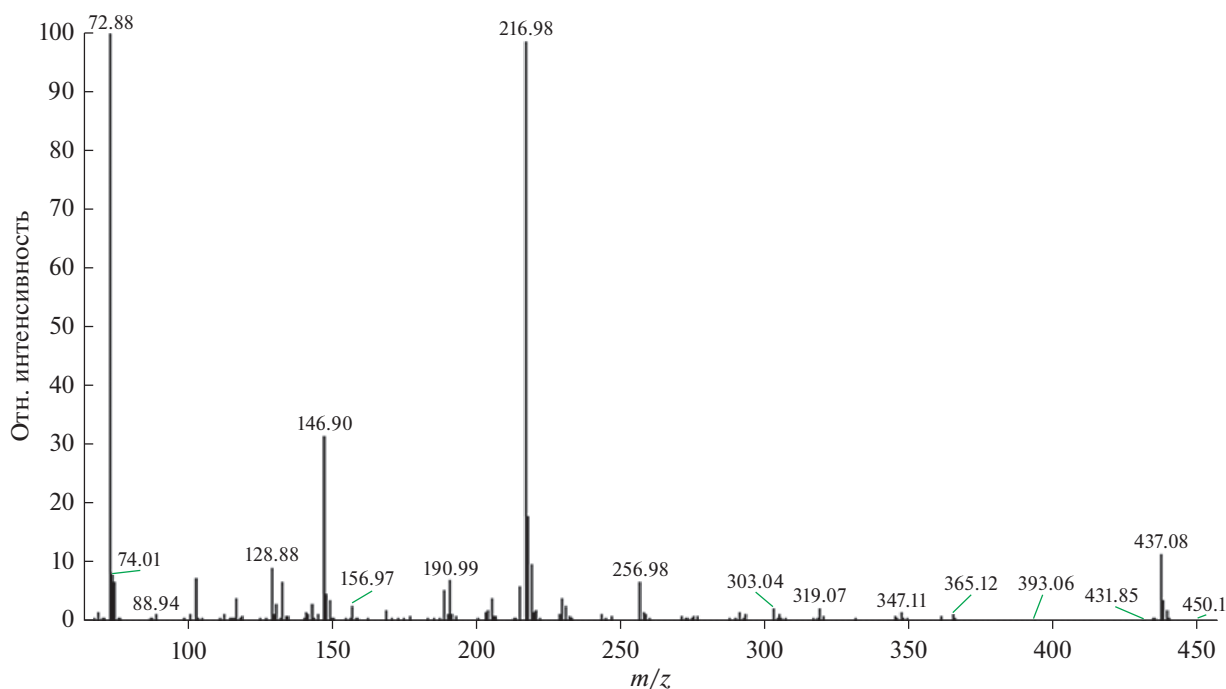


Рис. 5. Масс-спектр компонента со временем удерживания 12.07 мин.

метно отличающемся от предела обнаружения уровне зарегистрированы аналитические сигналы новых потенциальных биомаркеров во всех исследованных образцах пациентов, отсутствующие в образцах здоровых добровольцев. Когда удастся выяснить механизм появления фруктозы в образцах КВВ при БА и ХОБЛ и взаимосвязь с содержанием дисахаридов, потребуется оптимизация условий количественного анализа, выяснение варьирования концентрации фруктозы внутри выборок образцов пациентов и между ними. Для этой цели имеет смысл применять более доступные по части аппаратного оформления методы анализа, чем ГХ-МС. Кроме того, используемый в данной работе способ пробоподготовки хорошо подходит для нецелевого скрининга низкомолекулярных органических веществ, но для количественного определения сахаров у него есть ограничения. Одному исходному аналиту соответствует ряд образующихся силильных производных (это особенно заметно для дисахаридов). Соотношение этих пиков может меняться в зависимости от количества исходного вещества, что может отрицательно сказаться на результатах количественного анализа.

\* \* \*

В лиофилизатах образцов КВВ больных ХОБЛ и БА после силилирования обнаружены силильные производные моно- и дисахаридов, отсутствующие в образцах КВВ здоровых добровольцев. Моносахаридом с высокой долей вероятности является D-фруктоза. Представляет интерес дальнейшее исследование

образцов КВВ пациентов с указанными диагнозами на содержание моно- и дисахаридов, результаты которого могут помочь при выявлении взаимосвязи содержания обнаруженных веществ в образцах КВВ с особенностями биохимических процессов в организме человека, а также при диагностике протекания болезни.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в соответствии с исследовательским проектом № 20-03-00894.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maniscalco M., Fuschillo S., Paris D., Cutignano A., Sanduzzi A., Motta A. Clinical metabolomics of exhaled breath condensate in chronic respiratory diseases // *Adv. Clin. Chem.* 2019. V. 88. P. 121. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.10.002>
2. Xia J., Wishart D.S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis // *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2016. P. 14.10.1.
3. Maniscalco M., Paris D., Melck D.J., Molino A., Fuschillo S., Motta A. Metabolomics of exhaled breath condensate by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry: A methodological approach // *Curr. Med. Chem.* 2020. V. 27. P. 2381. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181008122749>
4. Maniscalco M., Fuschillo S., Paris D., Cutignano A., Sanduzzi A., Motta A. Clinical metabolomics of exhaled breath condensate in chronic respiratory diseases // *Adv. Clin. Chem.* 2019. V. 88. P. 121. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.10.002>
5. Rahimpour E., Khoubnasabjafari M., Jouyban-Gharamaleki V., Jouyban A. Non-volatile compounds in exhaled breath condensate: review of methodological as-

- pects // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 6411. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1259-4>
6. *Aksenov A.A., Zamuruyev K.O., Pasamontes A., Brown J.F., Schivo M., Foutouhi S., Weimer B.C., Kenyon N.J., Davis C.E.* Analytical methodologies for broad metabolite coverage of exhaled breath condensate // *J. Chromatogr. B.* 2017. V. 1061–1062. P. 17. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.038>
  7. *Carraro S., Cogo P.E., Isak I., Simonato M., Corradi M., Carnielli V.P., Baraldi E.* EIA and GC/MS analysis of 8-isoprostane in EBC of children with problematic asthma // *Eur. Respir. J.* 2010. V. 35. P. 1364. <https://doi.org/10.1183/09031936.00074909>
  8. *Corradi M., Folesani G., Andreoli R., Manini P., Bodini A., Piacentini G., Carraro S., Zanconato S., Baraldi E.* Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2003. V. 167. P. 395. <https://doi.org/10.1164/rccm.200206-507OC>
  9. *Corradi M., Rubinstein I., Andreoli R., Manini P., Cagliari A., Poli D., Alinovi R., Mutti A.* Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2003. V. 167. P. 1380. <https://doi.org/10.1164/rccm.200210-1253OC>
  10. *Montuschi P., Martello S., Felli M., Mondino C., Barnes P.J., Chiarotti M.* Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotriene B<sub>4</sub> in asthmatic children // *Respir. Res.* 2005. V. 6. Article 119. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-119>
  11. *Syslova K., Kačer P., Kuzma M., Novotny P., Pelcova D.* Determination of biomarkers in exhaled breath condensate: A perspective way in bronchial asthma diagnostics / *Bronchial Asthma – Emerging Therapeutic Strategies* / Ed. Sapey E. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. P. 37. <https://doi.org/10.5772/28350>
  12. *Tochino Y., Kanazawa H., Ichimaru Y., Asai K., Kyoh S., Hirata K.* N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, a major advanced glycation end product in exhaled breath condensate as a biomarker of small airway involvement in asthma // *J. Asthma.* 2007. V. 44. № 10. P. 861. <https://doi.org/10.1080/02770900701752573>
  13. *Родионов А.А., Ревельский А.И., Ревельский И.А., Анохина Т.Н., Анаев Э.Х.* Хроматомасс-спектрометрическое определение среднелетучих органических веществ в конденсате выдыхаемого воздуха // *Масс-спектрометрия.* 2007. Т. 4. № 2. С. 143. (*Rodionov A.A., Revelsky A.I., Revelsky I.A., Anokhina T.N., Anaev E.Kh.* Determination of semivolatiles organic compounds in exhaled breath condensate by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2014. V. 69. P. 1330.) <https://doi.org/10.1134/S1061934814140081>
  14. *Huszár É., Vass G., Vizi É., Csoma Z., Barát E., Molnár-Világos G., Herjavec I., Horváth I.* Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma // *Eur. Respir. J.* 2002. T. 20. № 6. С. 1393.
  15. *Асиятилова А.М.* Аденозин как показатель эффективности проводимой терапии у больных бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких // *Перспективы науки.* 2011. № 6 (21). С. 22.
  16. *Ryberg H., Caidahl K.* Chromatographic and mass spectrometric methods for quantitative determination of 3-nitrotyrosine in biological samples and their application to human samples // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 851. P. 160. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.02.001>
  17. *Rajendiran K.S., Ananthanarayanan P.H., Sathesh S., Rajappa M.* Elevated levels of serum sialic acid and high-sensitivity c-reactive protein: Markers of systemic inflammation in patients with chronic heart failure // *Brit. J. Biomed. Sci.* 2014. V. 71. P. 29. <https://doi.org/10.1080/09674845.2014.11669959>
  18. *Qaisar R., Karim A., Muhammad T.* Circulating biomarkers of handgrip strength and lung function in chronic obstructive pulmonary disease // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2020. V. 15. P. 311. <https://doi.org/10.2147/COPD.S225765>
  19. *Tankasala D., Linnes J.C.* Noninvasive glucose detection in exhaled breath condensate // *Trans. Res.* 2019. V. 213. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.05.006>
  20. *Baker E.H., Clark N., Brennan A.L., Fisher D.A., Gyi K.M., Hodson M.E., Philips B.J., Baines D.L., Wood D.M.* Hyperglycemia and cystic fibrosis alter respiratory fluid glucose concentrations estimated by breath condensate analysis // *J Appl. Physiol.* 2007. V. 102. P. 1969. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01425.2006>
  21. *Mirrahimov A.E.* Chronic obstructive pulmonary disease and glucose metabolism: A bitter sweet symphony // *Cardiovasc. Diabetol.* 2012. V. 11. Article 132. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-132>
  22. *Kaźmierczak M., Ciebiada M., Pēkala-Wojciechowska A., Pāwłowski M., Nielepkowicz-Goździńska A., Antczak A.* Evaluation of markers of inflammation and oxidative stress in COPD patients with or without cardiovascular comorbidities // *Heart. Lung Circ.* 2015. V. 24. № 8. P. 817. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-11-132>
  23. *Baker E.H., Janaway C.H., Philips B.J., Brennan A.L., Baines D.L., Wood D.M., Jones P.W.* Hyperglycaemia is associated with poor outcomes in patients admitted to hospital with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease // *Thorax.* 2006. V. 61. P. 284. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.051029>
  24. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких / Под ред. Чучалина А.Г. Пересмотр 2006: Пер. с англ. М.: Атмосфера, 2007.
  25. *Pinto-Plata V., Casanova C., Divo M., Tesfaigzi Y., Calhoun V., Jing Sui J., Polverino F., Priolo C., Petersen H., Torres J.P., Marin J.M., Owen C.A., Baz R., Cordova E., Celli B.* Plasma metabolomics and clinical predictors of survival differences in COPD patients // *Respir. Res.* 2019. V. 20. Article 219. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1167-y>
  26. *Saey D., Lemire B.B., Gagnon P., Bombardier E., Tupling A.R., Debigaré R., Côté C.H., Maltais F.* Quadriceps metabolism during constant workrate cycling exercise in chronic obstructive pulmonary disease // *J. Appl. Physiol.* 2011. V. 110. P. 116. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00153.2010>
  27. *Jackson T.C., Zhang Y.V., Sime P.J., Phipps R.P., Kottmann R.M.* Development of an accurate and sensitive method for lactate analysis in exhaled breath condensate by LC MS/MS // *J. Chromatogr. B.* 2017. V. 1061–1062. P. 468. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.07.041>