



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

## سنجش نشانگر زیستی IL-6 در هوای بازدمی با استفاده از دستگاه جمع‌آورنده میعانات بازدمی

مرتضی سیفی<sup>۱</sup>، نوشین راستکاری<sup>۲</sup>، محمد صادق حسونند<sup>۳</sup>، حسین ارفعی نیا<sup>۴</sup>، مسعود یونسیان<sup>۴\*</sup>

- ۱- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات آلودگی هوا، پژوهشکده محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۳- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- ۴- گروه روش شناسی و تحلیل اطلاعات، پژوهشکده محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله:

زمینه و هدف: جمع‌آوری میعانات هوای بازدمی، روشی غیرتهاجمی، ایمن و آسان است که جهت نمونه‌برداری از ریه‌ها و تحقیقات علمی و همچنین برآورد اثرات آلودگی هوا در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیبات موجود در میعانات هوای بازدمی اکثراً شامل مولکول‌های موجود در مسیرهای تنفسی است که توسط بخارات آب رقیق شده‌اند و شامل یون‌های ساده، هیدروژن پراکسید، پروتئین‌ها، سائوکاين‌ها، دزوکسی ریبونوکلیک اسید، کراتین، الکترولیت‌ها، عناصر جزئی و فلزات سمی هستند. هدف از این مطالعه سنجش نشانگر زیستی اینترلوکین شش (IL-6) با استفاده از دستگاه طراحی شده جهت جمع‌آوری میعانات بازدمی است.

روش بررسی: در این مطالعه دستگاهی جهت جمع‌آوری و متراکم کردن هوای بازدمی طراحی و ساخته شد. این دستگاه دمای هوای بازدمی را تا  $20^{\circ}\text{C}$  کاهش داده و هوای بازدمی از طریق میعان به مخلوط مایع و جامد تبدیل شده و متعاقب آن نشانگر زیستی اینترلوکین شش با استفاده از روش ۹۶ چاهکی ELISA و با استفاده از کیت تجاری HS600B R&D Kit اندازه‌گیری شد. در این مطالعه، میعانات هوای بازدمی ۳۶ فرد جوان سالم جمع‌آوری گردید. میعانات هوای بازدمی افراد جوان سالم پس از ۱۵-۱۰ min تنفس بصورت پیوسته در ویال جمع‌آوری گردید. یافته‌ها: در این مطالعه غلظت اینترلوکین شش در نمونه‌های گرفته شده توسط کیت مذکور  $1/08\text{ pg/mL}$  مشاهده شد. انحراف معیار غلظت نشانگر زیستی اینترلوکین شش  $0/47$  اندازه‌گیری شد. حجم میعانات هوای بازدمی در مطالعه حاضر بین  $1/2$  تا  $3/5\text{ mL}$  و میانگین آن  $2/3\text{ mL}$  برای هر فرد اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که حجم میعانات هوای بازدمی جمع‌آوری شده با استفاده از دستگاه طراحی شده در این مطالعه، با حجم جمع‌آوری شده با استفاده از وسایل مشابه خارجی قابل مقایسه است. همچنین میانگین غلظت اینترلوکین شش سنجش شده مشابه مقادیری بود که توسط سایر جمع‌آورنده‌ها در مطالعات مختلف گزارش شده است. نتایج نشانگر این است که می‌توان دستگاه ساخته شده را بعنوان یک ابزار مناسب جهت سنجش اینترلوکین شش در میعانات هوای بازدمی به محققین معرفی نمود.

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۴  
تاریخ ویرایش: ۹۶/۰۳/۲۱  
تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۲۴  
تاریخ انتشار: ۹۶/۰۳/۳۱

واژگان کلیدی: جمع‌آوری هوای بازدمی، نشانگر زیستی، میعانات بازدمی

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:  
yunesian@tums.ac.ir

## مقدمه

Exhaled Breath Condensate (EBC) یا همان میعانات بازدمی، روشی غیرتهاجمی، مناسب و ارزان است که جهت تحقیقات علمی و همچنین تشخیص بیماری‌های تنفسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از روش‌های برآورد اثرات آلودگی هوا در انسان بررسی نشانگرهای زیستی موجود در نمونه‌های خون و ادرار است. اما اخیراً روش جدیدی بنام جمع‌آوری میعانات بازدمی جهت برآورد اثرات آلودگی هوا مورد توجه قرار گرفته است (۱، ۲). همچنین می‌توان از طریق جمع‌آوری میعانات هوای بازدمی و اندازه‌گیری تغییرات نشانگرهای زیستی، برخی اثرات را تشخیص داد (۳، ۴). بیماری‌های آسم و انسداد ریوی، بیماری‌هایی التهابی رایجی هستند که باعث التهاب در ریه و افزایش ترشحات در راه‌های هوایی می‌شوند. با اندازه‌گیری نشانگرهای زیستی موجود در خون و جمع‌آوری میعانات هوای بازدمی می‌توان حالت و پیشرفت بیماری را نشان داد. EBC ترکیب مایعات مسیره‌های تنفسی را مشخص کرده و از این طریق به نحوه شناسایی و تشخیص بیماری کمک می‌کند. اجزای اولیه EBC شامل آئروسول‌های جمع‌آوری شده در مسیره‌های تنفسی، بخارات تقطیر شده اطراف آئروسول‌ها و گازهای فرار حل شده در بخارات آب تقطیر شده در مسیره‌های تنفسی است (۵). ترکیبات موجود در EBC اکثراً شامل مولکول‌های موجود در مسیره‌های تنفسی است که توسط بخارات آب رقیق شده‌اند و شامل یون‌های ساده، یون هیدروژن مثبت، هیدروژن پراکسید، پروتئین‌ها، سایتوکاین‌ها، Eicosanoids و ماکرومولکول‌هایی مثل موسین، فسفولیپید و DNA است. ترکیبات دیگری که در EBC یافت می‌شوند شامل کراتین، الکترولیت‌ها، عناصر جزئی و فلزات سمی است. پروتئین‌ها و نشانگرهای زیستی خاص در سلول‌های آلوئول ریه و نشانگرهای زیستی غیر فرار در سلول‌های اپیتلیوم تولید و در ذرات آئروسولی آزاد می‌شوند. در حین نفس کشیدن طبیعی، میزان ذرات آئروسولی بین  $0.4-0.1$  particle/cm<sup>3</sup> است، متوسط قطر این ذرات در حدود  $0.3 \mu\text{m}$  است و از طریق این ذرات آئروسولی

نشانگرهای زیستی جمع‌آوری می‌شوند (۶، ۷). EBC همچنین جهت آنالیز هوای بازدمی مورد استفاده قرار می‌گیرد بعنوان مثال برای تخمین گلوکز خون و تشخیص بیماری‌های ریوی مثل سرطان ریه استفاده شده است (۸، ۹). مطالعات نشان داده است که غلظت مارکرهای موجود در EBC در هنگام برخی بیماری‌ها از حالت عادی بیشتر است. تشخیص این ترکیبات به تکنولوژی در دسترس جهت آنالیز بستگی دارد (۱۴-۱۰). اخیراً مطالعاتی که جهت بررسی نشانگرهای زیستی میعانات بازدمی انجام می‌شود، پیشرفت چشمگیری داشته است. از این رو در مطالعات مختلف، ماکرومولکول‌های جدیدی در هوای بازدمی مورد شناسایی قرار گرفته است. جدول ۱ خلاصه‌ای از ترکیباتی است که در مطالعات گذشته، با استفاده از EBC در افراد با وضعیت مختلف جمع‌آوری و سپس سنجش شده‌اند (۱۵). اگرچه در سال‌های اخیر دستگاه‌ها و وسایل مختلفی با قابلیت‌های مشابه در برخی کشورهای پیشرفته تولید شده است، اما دستگاه حاضر با صرف هزینه به مراتب کمتر نسبت به معادل خارجی و نیز با سهولت بیشتر در دسترس محققین داخلی قرار می‌گیرد. همچنین این دستگاه نسبت به دستگاه‌ها و وسایل خارجی حجم کمتر و در برخی موارد قابلیت بالاتری جهت سنجش نشانگرهای زیستی دارد.

## مواد و روش‌ها

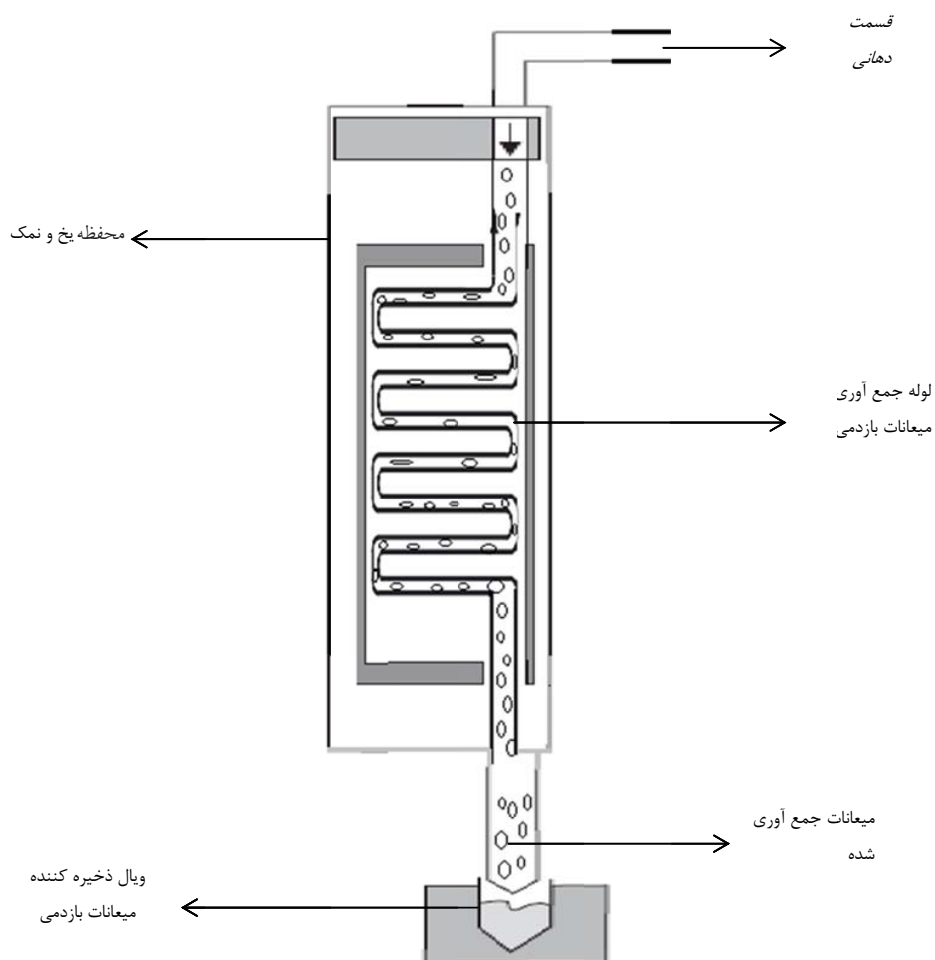
در این مطالعه جهت جمع‌آوری میعانات هوای بازدمی، وسیله با عنوان جمع‌آورنده میعانات بازدمی طراحی و ساخته شد. علت طراحی و ساخت این وسیله، عدم دسترسی به تجهیزات پیشرفته ساخته شده در این زمینه و هزینه بالای آنها جهت تامین بوده است. در ابتدا جهت طراحی و ساخت این وسیله، مطالعات انجام شده در این زمینه بررسی گردید و سپس با توجه به وسایل مورد استفاده در آن مطالعات، الگوی مناسب مد نظر قرار گرفت و در نهایت دستگاه جمع‌آورنده میعانات بازدمی طراحی و ساخته شد. این دستگاه دمای هوای بازدمی را تا  $20^{\circ}\text{C}$  - کاهش داده و هوای بازدمی را از طریق میعان به مخلوط مایع و جامد تبدیل می‌کند و متعاقب آن نشانگرهای

جدول ۱- ترکیباتی که در مطالعات گذشته، در میعانات هوای بازدمی افراد با وضعیت مختلف جمع‌آوری شده است

وضعیت افراد	ترکیبات
افراد سالم	هیدروژن پروکسید ( $H_2O_2$ )، ایزوپروستان ۸ (8-Isoporostane)، نیتریک اکسید (NO)، نیتروزیولز (RS-NOs)، سایتوکاین‌ها (شامل اینترلوکین - ۲، ۴، ۵، ۶، ۸، ۱۳، ۱۰ و تومورنکروزیس فاکتور آلفا)
افراد سیگاری	هیدروژن پروکسید ( $H_2O_2$ )، ایزوپروستان ۸ (8-Isoporostane) هیدروژن پروکسید ( $H_2O_2$ )، ایزوپروستان ۸ (8-Isoporostane)، سروتونین، سایتوکاین‌ها شامل اینترلوکین -۱ (IL-1)، رسپتور محلول اینترلوکین - مزمین (TNF-alfa)، تومورنکروزیس فاکتور آلفا (sIL-2R)
افراد آسمی	$H_2O_2$ ، ایزوپروستان ۸، نیترو تیروزین، تیوباربتوریک اسید، لکوترین‌ها، PH
برونشیت مزمن	لکوترین‌ها
برونشیت	$H_2O_2$
سیستیک فیبروزیس	$H_2O_2$ ، نیتريت، ایزوپروستان ۸، اینترلوکین -۸ (IL-8)

جهت تماس سطح بیشتری از لوله با یخ و نمک و تسریع در میعان هوای بازدمی، لوله پلی پروپیلنی بصورت مارپیچ طراحی گردید. در انتهای این وسیله ویالی قرار داده شده است که هوای بازدمی متراکم شده در آن ذخیره می‌شود. همچنین در این مطالعه با استفاده از دستگاه جمع‌آورنده، میعانات بازدمی ۳۶ فرد جوان سالم جمع‌آوری گردید (شکل ۲). مشخصات دموگرافیک و بالینی افراد جوان سالم نظیر سن، وضعیت کشیدن سیگار، سابقه بیماری‌ها و داروهای مصرفی با استفاده از پرسشنامه و از طریق مصاحبه خصوصی توسط پزشک در محل و ۳۰ دقیقه قبل از جمع‌آوری میعانات هوای بازدمی مورد بررسی قرار گرفت. افرادی که در یک هفته مانده به روز نمونه‌گیری، دارای بیماری‌های عفونی بودند از مطالعه حذف شدند. مشخصات افراد داوطلب در جدول ۲ ذکر شده است.

زیستی هوای بازدمی اندازه‌گیری می‌شود. شماتیک این دستگاه در شکل ۱ نشان داده شده است. در ساخت این دستگاه از لوله پروپیلنی، ظروف پلاستیکی از جنس پلی وینیل کلراید و فلز گالوانیزه (بعلت و ویژگی بارز آن در انتقال سرما) استفاده شده است. بخش اول این وسیله دهانی نام دارد که افراد مورد مطالعه آن را در دهان قرار داده و هوای بازدمی خود را به آرامی در آن می‌دمند. در ادامه دهانی، از شیر یکطرفه استفاده گردید که از ورود بزاق به داخل نمونه ممانعت می‌کند و سپس لوله پلی پروپیلنی قرار گرفته است که این لوله از مقاومت شیمیایی بالایی برخوردار بوده و درون محفظه حاوی یخ و نمک (جهت کاهش دما تا  $20^{\circ}C$ ) قرار داده شده است (تا زمانی که مخلوط یخ و نمک بصورت کریستال باشد دمای آن در محدوده کمتر و یا مساوی با  $21^{\circ}C$  قرار می‌گیرد).



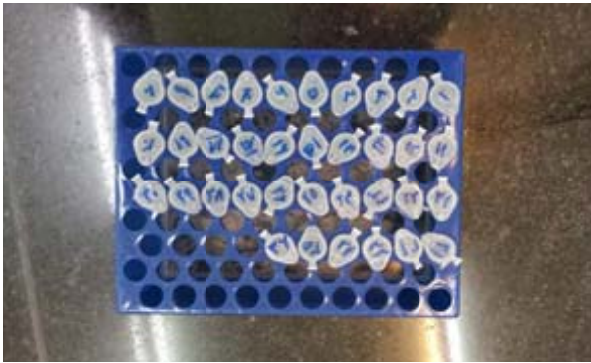
شکل ۱- شماتیکی از دستگاه جمع‌آورنده میعانات بازدمی

جهت نمونه‌گیری، افراد روی صندلی نشسته بودند، در این حالت دم از طریق بینی و بازدم از طریق دهان انجام گرفت و بازدم از بخش دهانی وارد جمع‌آورنده شد. EBC افراد پس از ۱۵-۱۰ دقیقه دمش در دستگاه، بصورت پیوسته و مداوم، به میزان ۳-۱ mL مخلوط مایع و جامد جمع‌آوری گردید. دستگاه طراحی شده جهت جمع‌آوری نشانگرهای زیستی اینترلوکین شش مورد استفاده قرار گرفت که پس از جمع‌آوری، در دمای ۸۰- و در ویال‌های پروپیلنی ذخیره گردید، سپس نشانگرهای زیستی مورد نظر با استفاده از کیت تجاری HS600B R&D Kit سنجش شدند. مراحل سنجش نشانگر زیستی اینترلوکین شش در شکل ۲ بیان شده است.

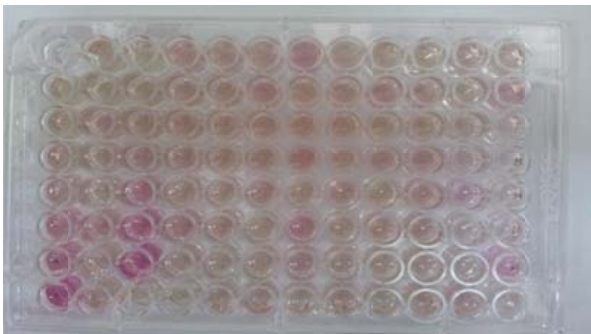
جدول ۲- مشخصات افراد جوان سالم داوطلب\*

جنس	مرد
سن (سال)	۱۶±۱
وزن (kg)	۵۵(۶۵-۴۵)
قد (cm)	۱۷۱(۱۸۰-۱۶۰)
سیگاری	همه افراد غیر سیگاری بودند

\*تعداد افراد شرکت کننده ۳۶ نفر است.



شکل ۳- شمایی از نمونه‌های کدگذاری شده



شکل ۴- شمایی از سنجش نشانگرها زمانی که آنتی ژن با تشکیل شدن فرآورده‌های رنگی، مشخص می‌شود



شکل ۲- مراحل کلی سنجش نشانگرهای زیستی با استفاده از روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

۰/۵ و ۰/۷۵ بترتیب برابر با ۰/۷۶، ۰/۹۶ و ۱/۳۳ شد. انحراف معیار غلظت نشانگر زیستی اینترلوکین شش ۰/۴۷ اندازه‌گیری شد. حجم EBC در مطالعه حاضر بین ۱/۲ mL تا ۳/۵ mL و میانگین آن ۲/۳ mL برای هر فرد اندازه‌گیری شد (۷). یافته‌های این مطالعه همچنین نشان دادند که نسبت نمونه‌های مثبت به منفی و نمونه‌های از دست رفته به کل نمونه‌ها بترتیب برابر با ۳۶/۲ و ۰/۳۸ بوده است.

### یافته‌ها

در این مطالعه پس از جمع‌آوری میعانات بازدمی، نشانگرهای زیستی اینترلوکین شش با استفاده از کیت ذکر شده سنجش شدند. نتایج اندازه‌گیری اینترلوکین شش در جدول ۳ و ۴ آورده شده است. همچنان‌که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، غلظت نشانگر زیستی اینترلوکین شش بین ۰/۳ تا ۲/۳ و میانگین ۱/۰۸ pg/mL بوده است. همچنین صدک ۰/۲۵،

جدول ۳- مقادیر سنجش شده سایتوکاین‌ها در سیستم‌های مختلف جمع‌آوری میعانات بازدمی

P-value	اکو اسکرین	شیشه‌ای اصلاح شده	شیشه‌ای	سیلیکونی	دستگاه حاضر	پارامتر
-	۱۰/۱۲	۱/۱۲	۳۷/۱۲	۴۹/۱۲	۰/۳۸	نمونه‌های از دست رفته به تعداد کل نمونه‌ها
۰/۲۹	۰/۶(۰/۴-۱/۵)	۰/۷(۰/۳-۱/۹)	۰/۹(۰/۴-۱/۶)	۰/۹(۰/۴-۱/۴)	۱/۰۸(۰/۲-۳/۳)	غلظت IL-۶ (ml/pg)
۰/۶۳	۲/۰۱(۱/۲-۵/۷)	۲/۰۲۵(۱/۲-۶/۵)	۱/۹(۱/۲-۲/۴)	۱/۷(۰/۲-۹/۵)	۲/۳(۱/۳-۲/۵)	حجم میعانات (mL)
۰/۸۲	۴۳/۶۷	۴۸/۷۱	۴۵/۳۸	۴۱/۳	۳۶/۲	نسبت نمونه‌های مثبت به منفی

جدول ۴- مقادیر سنجش شده اینترلوکین شش در میعانات بازدمی

نشانگرهای زیستی	تعداد نمونه (عدد)	میانگین	انحراف معیار	ماکزیمم	مینیمم	صدک		
						۰/۷۵	۰/۵	۰/۲۵
IL-6 هوای بازدمی (pg/mL)	۳۶	۱/۰۸	۰/۴۷	۲/۳	۰/۳	۰/۷۳	۰/۹۶	۱/۳۳

## بحث

یکی از جدیدترین روش‌های برآورد اثرات آلودگی هوا در انسان بررسی نشانگرهای زیستی موجود در میعانات بازدمی است (۱، ۲). مزیت اصلی این روش، غیرتهاجمی، ایمن و بدون ضرر بودن آن است که حتی در افراد حساس مثل کودکان و افراد دارای بیماری تنفسی نیز ضرری ندارد (۷، ۱۶، ۱۷). از محدودیت‌های اصلی EBC، پایین بودن غلظت نشانگرهای زیستی موجود در میعانات بازدمی نسبت به سایر میعانات بدن است (۱۷). در مطالعه حاضر دستگاه جهت جمع‌آوری میعانات بازدمی طراحی و ساخته شد. در این دستگاه ارتفاع و قطر فلز گالوانیزه به گونه‌ای انتخاب شد که براحتی درون ظرف قرار گیرد و انتقال سرما را تسهیل بخشد. علت استفاده از لوله‌های پلی پروپیلنی، عدم آسیب به نشانگرهای زیستی هوای بازدمی است و همچنین دلیل استفاده از ظروفی از جنس پلی وینیل کلراید قابل حمل و سبک بودن آن و قابلیت استفاده به دفعات زیاد است. در مطالعه حاضر به افراد داوطلب توصیه گردید با نرخ کم و بصورت طبیعی تنفس کنند که باعث می‌شود مواد غیر فرار مثل پروتئین‌های موجود در آئروسول‌ها از طریق هوای بازدمی منتقل شوند. جهت ذخیره میعانات هوای بازدمی از ویال‌های پروپیلنی استفاده شد. توصیه می‌شود که از ویال‌های پلی استیرن بدلیل خاصیت جذب برخی ترکیبات استفاده نشود (۱۵). حجم EBC جمع‌آوری شده با استفاده از دستگاه طراحی شده بین ۱/۲ mL تا ۳/۵ mL و میانگین آن ۲/۳ mL است که نسبت به حجم EBC جمع‌آوری شده توسط جمع‌آورنده‌های شیشه‌ای و سیکلونی بیشتر است. همچنین در مطالعه‌ای که در آن مقایسه‌ای بین حجم میعانات بازدمی جمع‌آوری شده توسط جمع‌آورنده شیشه‌ای بهینه شده با جمع‌آورنده

اکواسکرین، شیشه‌ای و سیلیکونی انجام شده است، بهترین کارایی را جمع‌آوری شیشه‌ای اصلاح شده (بهینه شده) و کمترین کارایی را جمع‌آورنده سیلیکونی داشته است (۲۰-۱۸). میانگین غلظت نشانگر زیستی اینترلوکین شش در مطالعه حاضر ۱/۰۸ pg/mL مشاهده گردید در حالی که در مطالعات مختلف برای سایر جمع‌آورنده‌ها بین ۰/۱-۶/۹ pg/mL بوده است. اگرچه در مطالعاتی که از جمع‌آورنده‌های شیشه‌ای استفاده شده است، غلظت نشانگرهای زیستی کمتری نسبت به سایر جمع‌آورنده‌ها مشاهده گردیده است. تغییرات در غلظت نشانگرها را می‌توان به کیفیت تغلیظ شدن، نوع ذخیره کردن و یا حساسیت تست‌ها و آنالیزهای سنجش نسبت داد (۲۵-۲۱). در مطالعات مختلف گزارش شده است که جمع‌آوری EBC در ابتدای روز، وسط روز و در وسط هفته تفاوت معنی‌داری از نظر غلظت سایتوکاین‌ها نداشته است (۲۰). از آنجایی که بیشتر حجم EBC را بخار آب تشکیل می‌دهد، روش‌های متداول سنجش، برای اندازه‌گیری نشانگرهای زیستی مناسب نیستند به این دلیل که حجم میعانات بالایی نیاز است و باعث می‌شود مایع بیولوژیکی با بخار آب رقیق شود. اخیراً از روش‌های سنجشی استفاده می‌شود که نیاز به حجم نمونه کمتر و دارای حساسیت بالایی (مثل کیت‌های تجاری) هستند که این عوامل باعث افزایش دقت اندازه‌گیری می‌شود. بنابراین با بهینه شدن جمع‌آورنده و حداقل چسبندگی نشانگرهای زیستی، باعث می‌شود تکرارپذیری اندازه‌گیری‌های مختلف در EBC بهبود یابد (۱۱، ۲۶-۲۸). جمع‌آوری EBC با استفاده از وسایل متنوع که طراحی‌های مختلفی داشته‌اند موفقیت‌آمیز گزارش شده‌اند (۲۱، ۲۹، ۳۰). استفاده از وسایل تجاری در دسترس ممکن است به غلبه بر مشکلات بالقوه استفاده از

می توان دستگاه ساخته شده را بعنوان یک ابزار مناسب برای تحقیق بر روی هوای بازدومی جهت سنجش نشانگرهای زیستی به محققین معرفی نمود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از طرح تحقیقاتی با کد ۹۲-۰۱-۴۶-۲۱۸۱۰ مصوب مرکز تحقیقات آلودگی هوا پژوهشکده محیط زیست دانشگاه علوم پزشکی تهران است که بدین وسیله از حمایت مرکز تحقیقات آلودگی هوا پژوهشکده محیط زیست تشکر می گردد. همچنین از همکاری صمیمانه مرکز آموزش بیماری (مرآبھی) شهید هجرتی نیروی زمین ارتش که مرحله میدانی این مطالعه در آنجا انجام شد قدردانی می شود.

وسایل مختلف کمک کند اما شواهد نشان نمی دهد که استفاده از وسایل تجاری نتایج بهتر و تکرارپذیرتری در سنجش نشانگرهای زیستی دارند (۷).

### نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که با استفاده از دستگاه طراحی شده حجم بیشتری از میعانات بازدومی در مقایسه با وسایل استفاده شده در سایر مطالعات بدست آمده است. همچنین در این مطالعه نشانگر زیستی اینترلوکین شش در میعانات بازدومی جمع آوری شده اندازه گیری گردید. از مزایای دیگر این دستگاه سبک و کم هزینه بودن آن و همچنین سهولت دسترسی و قابلیت استفاده به دفعات زیاد آن است. با توجه به این مزایا و مشکلات بالقوه در استفاده از وسایل تجاری موجود

### منابع

1. Manney S, Meddings C, Harrison R, Mansur A, Karakatsani A, Analitis A, et al. Association between exhaled breath condensate nitrate+ nitrite levels with ambient coarse particle exposure in subjects with airways disease. *Occupational and Environmental Medicine*. 2012;69(9):663-69.
2. Epton MJ, Dawson RD, Brooks WM, Kingham S, Aberkane T, Cavanagh J, et al. The effect of ambient air pollution on respiratory health of school children: a panel study. *Environmental Health*. 2008;7(1):doi:10.1186/1476-069X-7-16.
3. Sidorenko G, Zborovskii E, Levina D. Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function). *Terapevticheski Arkhiv*. 1979;52(3):65-68.
4. Liu J, Conrad D, Chow S, Tran V, Yates D, Thomas P. Collection devices influence the constituents of exhaled breath condensate. *European Respiratory Journal*. 2007;30(4):807-808.
5. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski T, Turner R, Nguyen T, Smith A, et al. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *European Respiratory Journal*. 2003;22(6):889-94.
6. Hoffmeyer F, Raulf-Heimsoth M, Brüning T. Exhaled breath condensate and airway inflammation. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2009;9(1):16-22.
7. Horvath I, Hunt J, Barnes P. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *European Respiratory Journal*. 2005;26(3):523-48.
8. Anglim PP, Alonzo TA, Laird-Offringa IA. DNA methylation-based biomarkers for early detection

- of non-small cell lung cancer: an update. *Molecular Cancer*. 2008;7(1):doi:10.1186/1476-4598-7-81.
9. Roberts K, Jaffe A, Verge C, Thomas PS. Noninvasive monitoring of glucose levels: is exhaled breath the answer? *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2012;6(3):659-64.
  10. Montuschi P. Review: Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: Methodological aspects and potential clinical applications. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2007;1(1):5-23.
  11. Jackson AS, Sandrini A, Campbell C, Chow S, Thomas PS, Yates DH. Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175(3):222-27.
  12. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, Resta O, Carpagnano F, Mulé G, et al. 3p microsatellite signature in exhaled breath condensate and tumor tissue of patients with lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008;177(3):337-41.
  13. Krishnan A, Chow S, Thomas P, Malouf M, Glanville A, Yates D. 221: Exhaled breath condensate pepsin: A new noninvasive marker of GERD after lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2007;26(2):doi:10.1016/j.healun.2006.11.239.
  14. Corradi M, Pesci A, Casana R, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, et al. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide*. 2003;8(1):26-30.
  15. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001;164(5):731-37.
  16. Rosias PP, Dompeling E, Hendriks HJ, Heijmans JW, Donckerwolcke RA, Jöbsis Q. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2004;15(1):4-19.
  17. Horvath I, De Jongste J. *European Respiratory Monograph, Number 49: Exhaled Biomarkers*. Plymouth, UK: European Respiratory Society; 2010.
  18. Kharitonov SA. Exhaled markers of inflammatory lung diseases: ready for routine monitoring? *Swiss Medical Weekly*. 2004;134(13/14):175-92.
  19. Rosias PP, Robroeks CM, Niemarkt HJ, Kester AD, Vernooij JH, Suykerbuyk J, et al. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *European Respiratory Journal*. 2006;28(5):1036-41.
  20. Rosias PP, Robroeks CM, Kester A, den Hartog GJ, Wodzig WK, Rijkers GT, et al. Biomarker reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers. *European Respiratory Journal*. 2008;31(5):934-42.
  21. Schleiss M, Holz O, Behnke M, Richter K, Magnusson H, Jorres R. The concentration of hydrogen peroxide in exhaled air depends on expiratory flow rate. *European Respiratory Journal*. 2000;16(6):1115-18.
  22. Rahman I. Reproducibility of oxidative stress biomarkers in breath condensate: are they reliable? *The European Respiratory Journal*. 2004;23(2):183-84.
  23. Rahman I, Biswas SK. Non-invasive biomarkers of oxidative stress: reproducibility and methodological issues. *Redox Report*. 2004;9(3):125-43.
  24. Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, Poli D, Manini P, Vettori MV, et al. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulmonary Medicine*. 2005;5(1):doi:10.1186/1471-2466-5-10.
  25. ATS Workshop Proceedings. Exhaled nitric oxide and nitric oxide oxidative metabolism in exhaled breath condensate: Executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;173(7):811-13.
  26. Huszar E, Szabo Z, Jakab A, Barta I, Herjavec I, Horvath I. Comparative measurement of thromboxane A2 metabolites in exhaled breath condensate by different immunoassays. *Inflammation Research*. 2005;54(8):350-55.
  27. Robroeks CM, Jöbsis Q, Damoiseaux JG, Heijmans PH, Rosias PP, Hendriks HJ, et al. Cytokines in exhaled breath condensate of children with asthma and cystic fibrosis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2006;96(2):349-55.
  28. De Jager W, Rijkers GT. Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison. *Methods*. 2006;38(4):294-303.
  29. Jobsis Q, Raatgeep H, Hermans P, De Jongste J.



Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *European Respiratory Journal*. 1997;10(3):519-21.

30. Fabian P, McDevitt JJ, DeHaan WH, Fung RO, Cowling BJ, Chan KH, et al. Influenza virus in human exhaled breath: an observational study. *PloS One*. 2008;3(7): doi:10.1371/journal.pone.0002691.



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



## Determination of biomarker IL-6 in exhaled breath condensate using exhaled breath condensate collector

M Seifi<sup>1</sup>, N Rastkari<sup>2</sup>, MS Hassanvand<sup>2</sup>, H Arfaeinia<sup>3</sup>, M Younesian<sup>2,4\*</sup>

1- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Center for Air Pollution Research (CAPR), Institute for Environmental Research (IER), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Research Methodology and Data Analysis, Institute for Environmental Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### ARTICLE INFORMATION:

**Received:** 14 March 2017

**Revised:** 11 June 2017

**Accepted:** 14 June 2017

**Published:** 21 June 2017

**Key words:** Exhaled breath condensate, Biomarker, Condenser

**\*Corresponding Author:**

yunesian@tums.ac.ir

### ABSTRACT

**Background and Objective:** The collection of exhaled breath condensate (EBC) is a noninvasive, safe and simple technique to obtain direct samples from lung and use for estimation of the effects of air pollution on human subjects. EBC contains several compounds including simple ions, hydrogen peroxide, proteins, cytokines, deoxyribonucleic acid (DNA), creatine, Electrolytes, trace elements and toxic metals that are diluted by water vapor. The objective of this study was to determine biomarker IL-6 in exhaled breath condensate using an exhaled breath condensate collector.

**Materials and Methods:** The collector was designed and built and was used for collection and condensation of exhaled breath. EBC was taken from 36 young participants. Each person was asked to breathe for 10-15 min and the condensate was kept in a vial. The samples of exhaled breath were cooled down to -20 °C using the collector. The exhaled breath was converted to the solid/liquid mixture and then, the biomarker IL-6 was measured with ELISA (Enzyme -linked immunosorbent assay) method using HS600B R&D Kit.

**Results:** The mean concentration of IL-6 was 1.08 pg/mL in collected samples. The standard deviation of IL-6 concentration was 0.47. Moreover, the average volume of collected EBC was 2.3 mL, ranged between 0.3 and 3.5 mL.

**Conclusion:** The results of this study showed that the volume of the exhaled breath condensate was comparable with similar commercial devices. The average concentration of interleukin-6 was similar to the concentrations reported by other studies. Based on the findings, this equipment can be used by researchers as a suitable device for measurement of IL-6 in exhaled breath condensate.