

Возможности ЯМР ^{13}C -спектроскопии высокого разрешения для метаболомического анализа ротовой жидкости

А.В. МИТРОНИН*, д.м.н., проф., зав. кафедрой

А.А. ПРОКОПОВ**, д.х.н., проф., зав. кафедрой

Е.А. СРЕБНАЯ*, асп.

В.И. ПРИВАЛОВ***, к. физ.-мат. н., старш. научн. сотр.

*Кафедра кариесологии и эндодонтии

**Кафедра общей и биорганической химии

ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова

***Лаборатория химии координационных полиядерных соединений ФГБУН ИОНХ им. Н.С. Курнакова РАН, Москва

Opportunities of ^{13}C NMR spectroscopy of high resolution for metabolomic analysis of oral liquid

A.V. MITRONIN, A.A. PROKOPOV, E.A. SREBNAYA, V.I. PRIVALOV

Резюме: ЯМР-спектроскопия приобретает возрастающее значение в медицине в качестве инструмента метаболомического скрининга патологических изменений в биологических жидкостях. Углерод составляет основу наиболее значимых в биологическом отношении молекул, а ЯМР ^{13}C -спектроскопия предполагает прямое измерение этих соединений. Было проведено клиническое обследование пациентов — мужчин и женщин — в возрасте от 18 до 30 лет. Особое внимание было уделено обнаружению клиновидных дефектов твердых тканей зубов на разных этапах формирования данной патологии, а также сопутствующим факторам ее возникновения. Методом лабораторного исследования была выбрана спектроскопия магнитного резонанса ядер изотопа углерода ^{13}C образцов ротовой жидкости здорового человека (контроль) и пациентов с выраженными клиновидными дефектами зубов. Проведенное исследование показало аналитические возможности спектроскопии ротовой жидкости методом ЯМР ^{13}C высокого разрешения и перспективные направления для поиска маркеров заболеваний стоматологического профиля на их начальных стадиях.

Ключевые слова: клиновидные дефекты, метаболомика, молодые пациенты, ротовая жидкость, ЯМР-спектроскопия.

Abstract: NMR-spectroscopy has a growing importance in medicine as a tool for metabolic screening for abnormalities in biological fluids. Carbon is the basis of the most biologically significant molecules and ^{13}C NMR spectroscopy involves the direct measurement of these compounds. Clinical examination of patients, men and women, aged from 18 to 30 years, was carried out. Particular attention was paid to the detection of wedge-shaped defects of teeth hard tissues at various stages of this disease, as well as co-factors of its occurrence. NMR spectroscopy of carbon isotope ^{13}C nuclei of oral liquid samples from a healthy person (control) and patients with severe wedge-shaped lesions was chosen as a laboratory testing method. Studies have shown the analytical capabilities of oral liquid ^{13}C NMR spectroscopy of high resolution and promising directions for finding markers of dental diseases in their early stages.

Key words: metabolomics, NMR spectroscopy, oral liquid, wedge-shaped lesions, young patients.

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) приобретает все возрастающее значение в медицине не только как основа МРТ, но и в качестве инструмента метаболомического скрининга патологических изменений в биологических жидкостях [1], что является одной из основных задач метаболомики. Методом ЯМР уже исследован широкий круг биологических объектов, в том числе моча, кровь, спинномозговая жидкость, сок поджелудочной железы, желчь, пот, желудочный сок [2]. Спектры биологических жидкостей часто включают в себя до нескольких сотен сигналов, и существующие электронные банки спектральных данных во многих случаях позволяют выполнить удовлетворительное отнесение сигналов при наличии соответствующего поискового

и симуляционного программного обеспечения [3]. В идеальных случаях при анализе спектров удается обнаружить уверенно интерпретируемые отклонения от нормы, что способствует правильной диагностике и, следовательно, оптимальному выбору технологии лечения. Метаболомика как наука пока находится в начальной фазе своего развития, но ее уникальные успехи уже привели к практическому применению в университетских клиниках Великобритании, Испании, Франции, Норвегии, Германии, где ЯМР-спектрометры установлены рядом с операционными блоками [1].

Опубликованы результаты сотен исследований биологических объектов методом ЯМР-спектроскопии и накопленный опыт обобщен в виде методологиче-

ских рекомендаций [4]. Применению метода ЯМР к решению задач стоматологического профиля посвящено несколько десятков работ, и только некоторые из них имеют фундаментальный характер [5, 6]. При этом почти во всех публикациях описано применение ЯМР-спектроскопии протонов (^1H) [7, 8]. Биологические жидкости сложны по составу, содержат большое количество протонов и поэтому их ЯМР-спектры довольно трудно разрешимы. В этом плане чрезвычайно ценной альтернативой протонному магнитному резонансу является спектроскопия ЯМР углерода-13 (^{13}C). В целом плюсы этого метода омрачаются его низкой чувствительностью (содержание изотопа ^{13}C в природных объектах составляет только 1,1% от содержания ^{12}C , чувствительность ЯМР ^{13}C примерно в 60 раз меньше чувствительности ЯМР ^1H). В то же время эти минусы преодолеваются как за счет увеличения количества исследуемого образца, так и за счет увеличения числа накопления сканов. ЯМР ^{13}C -спектроскопия привлекательна для исследователя биологических субстратов, поскольку именно углерод составляет основу наиболее значимых в биологическом отношении молекул, а ^{13}C ЯМР предполагает прямое измерение этих соединений.

Спектроскопия ^{13}C ЯМР имеет и ряд других преимуществ по сравнению с протонным ЯМР, а именно: значительная дисперсия химического сдвига, хорошо разрешенные сигналы спектров, определение четвертичных атомов углерода, которые не связаны с протонами, прямое определение на углеродной структуры большинства метаболитов. Область химических сдвигов сигналов различных типов в спектрах ЯМР ^{13}C существенно шире по сравнению со спектрами ^1H (порядка 250 миллионных долей для ^{13}C вместо 12 для ^1H). Для исследования метаболизма эти преимущества весьма существенны, и в настоящее время в печати появляются первые работы, посвященные применению спектроскопии ^{13}C ЯМР для анализа биологических объектов, в том числе и слюны [9–11].

Для практических целей диагностики нет необходимости идентифицировать все вещества в составе слюны, достаточно установить устойчивые отличительные признаки спектров биожидкости здорового и больного человека. Причем эти различия могут касаться как состава слюны, так и концентрации ее компонентов. Современные аналитические техники нередко позволяют работать с нативными биожидкостями без их предварительной обработки. В насто-

ящей работе анализу подвергали ротовую жидкость (смешанную слюну), используя в дальнейшем собирательный термин «слюна».

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение возможности метаболического профилирования слюны методом ЯМР ^{13}C , сопоставляя спектры слюны здорового человека и слюны пациентов с клиновидными дефектами твердых тканей зубов, имея в виду дальнейшее использование метода ЯМР ^{13}C для ранней диагностики и контроля эффективности проводимого лечения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На базе кафедры кариесологии и эндодонтии МГМСУ им. А.И. Евдокимова было проведено клиническое исследование пациентов — мужчин и женщин — в возрасте от 18 до 30 лет. Особое внимание было уделено обнаружению клиновидных дефектов твердых тканей зубов, установлению этапа формирования данной патологии, а также сопутствующим факторам ее возникновения (особенностям индивидуальной гигиены полости рта, факторам окклюзионной перегрузки, приему кислотосодержащих продуктов питания). В качестве материала лабораторного исследования была использована ротовая жидкость пациентов с клиновидными дефектами твердых тканей зубов.

Сбор ротовой жидкости осуществлялся натошак, в утренние часы, путем сплевывания в стерильную емкость. Пациентам были даны рекомендации воздержаться от чистки зубов и применения дополнительных гигиенических средств непосредственно перед сбором слюны. Выполнение данной рекомендации было необходимо для исключения вероятности попадания частичек зубной пасты или других средств гигиены в исследуемые образцы во избежание получения ложных результатов.

Для контроля был осуществлен сбор ротовой жидкости пациентов той же возрастной группы, но без клинических признаков клиновидных дефектов твердых тканей зубов. Получение образца проводилось при тех же условиях.

Методом лабораторного исследования была выбрана спектроскопия ядер изотопа углерода -13 (^{13}C) образцов ротовой жидкости здорового человека (контроль) и пациентов с выраженными клиновидными дефектами зубов (образцы №1 и №2). Образцы слюны в калиброванных ЯМР-ампулах диаметром 5 мм, заполненных на высоту 50 мм, помещали в датчик спектрометра ЯМР для записи спектров. Спектры ЯМР записаны при комнатной температуре пробы 300K на спектрометре Bruker «AVANCE-300». Параметры записи спектров — резонансная частота ^{13}C 75,5 МГц, длительность импульсов возбуждения 4 мкс (30-градусный импульс), период следования импульсов 1 с, число накопления сканов — 10 000.

Регистрация спектров ЯМР ^{13}C осуществлена в режиме широкополосного протонного подавления, когда сильным радиочастотным полем облучается вся область резонанса протонов. При этом происходит насыщение спинов протонов, и спин-спиновые взаимодействия ^{13}C - ^1H не проявляются, что позволяет получать резонансные сигналы атомов углерода в виде синглетов вместо мультиплетов.

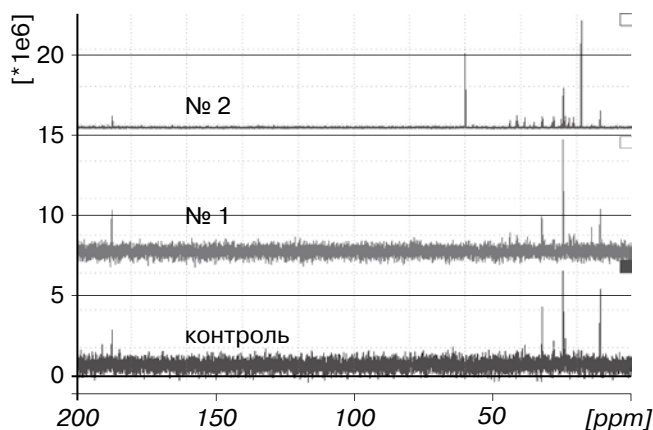


Рис. 1. Обзорные спектры слюны ЯМР ^{13}C с широкополосным подавлением протонов

Все химические сдвиги в миллионных долях (м.д.) приведены относительно тетраметилсилана как внешнего эталона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены спектры ЯМР ^{13}C с широкополосным подавлением протонов контрольного образца слюны и двух образцов №1 и №2 от пациентов с клиновидными дефектами зубов; наиболее сильные сигналы на спектрах пронумерованы.

Наибольший интерес представляло присутствие в слюне мажорных низкомолекулярных метаболитов органического происхождения, поскольку совокупность минорных метаболитов подвержена значительным разнонаправленным флуктуациям и вряд ли может иметь диагностическое значение.

Сразу обращают на себя внимание синглеты 2 и 5 атомов углерода, которые соответствуют CH_3 - и CH_2 -группам молекулы этилового спирта, причем из спектров следует, что этанол имеется в контрольном образце и в образце №2. Поскольку сам факт присутствия этого вещества в ротовой полости имеет разнообразные аспекты, включая и юридические, следует принять во внимание, что этиловый спирт является естественным метаболитом человеческого организма, он постоянно присутствует в крови человека, хотя и в очень небольших концентрациях — до 0,15 мг% (0,0015 промилле) [12]. Опубликована работа, в которой доказывается, что появление этанола в выдыхаемом воздухе, а, следовательно, и в слюне, может быть индуцировано даже медитацией в области алкогольной тематики [13].

Это обстоятельство, как бы сомнительно оно ни выглядело, а также то, что этанол очень долго сохраняется в слюне [14], независимо от его источника (спирт может быть обнаружен и во фруктах), однозначно указывает на невозможность использования факта присутствия или отсутствия этого вещества в слюне в качестве указателя на какое-то отклонение от нормы.

Синглеты 1 и 4 атомов углерода ^{13}C соответствуют CH_3 - и CH_2 -группам пропионовой кислоты, синглет 3 принадлежит CH_3 -группе уксусной кислоты, а синглет 6 отвечает CH -группе муравьиной кислоты.

Спектры ЯМР ^{13}C показывают, что во всех трех образцах слюны имеются значительные количества пропионовой, уксусной и муравьиной кислот с разными соотношениями концентраций. Как известно, патогенные микроорганизмы в полости рта выделяют летучие соединения, представленные, в частности, упомянутыми короткоцепочечными органическими кислотами [15, 16]. В зависимости от патологии меняется соотношение концентраций этих соединений, а успешная терапия приводит снижению содержания кислот в ротовой жидкости [17]. В то же время номенклатура обнаруживаемых кислот при различных патологиях нуждается в дополнительном исследовании и уточнении, поскольку спектр ЯМР ^{13}C не показывает присутствия в слюне масляной кислоты при выраженных клиновидных дефектах зубов, тогда как в следовых количествах эта кислота имеется [18].

Вызывает интерес существенный сигнал-6 атома углерода муравьиной кислоты при 184 м.д. Нельзя исключить, что появление в спектре ЯМР ^{13}C именно этого сигнала может служить указанием на возникновение фактора предрасположенности к клиновидным поражениям зубов, поскольку химическая агрессивность муравьиной кислоты значительно выше, чем у ее прекурсора — молочной кислоты (лактата). Метаболический переход от молочной кислоты к муравьиной понятен и реализуется при усилении активности разнообразных форм бактерий родов *Veillonella*, *Neisseria*, *Fusobacterium* и ряда других. Деятельность этих бактерий при определенных условиях, превышающих компенсаторные возможности слюны, приводит к микробиологическим нарушениям, сопровождающимся развитием патологических состояний и соответствующими неблагоприятными последствиями.

Проведенное исследование показало аналитические возможности спектроскопии ротовой жидкости методом ЯМР ^{13}C высокого разрешения и перспективные направления для поиска маркеров заболеваний стоматологического профиля на их начальных стадиях.

Поступила 25.10.2016

Координаты для связи с авторами:
127473, г. Москва, Делегатская, д. 20/1

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айхофф У., Шпрауль М., Пётто М. ЯМР высокого разрешения в биологических жидкостях и тканях // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Физ.-матем. науки. 2012. Т. 154. Книга 1. С. 23–32.
2. Ajhoff U., Shpraul' M., P'otto M. JaMR vysokogo razreshenija v biologicheskikh zhidkostjakh i tkanjah // Uchen. zap. Kazan. un-ta. Ser. Fiz.-matem. nauki. 2012. T. 154. Kniga 1. S. 23–32.
3. Kutysenko V. P., Molchanov M., Beskaravayny P. et al. Analyzing and mapping sweat metabolomics by high-resolution NMR spectroscopy // PLoS ONE 6(12): e28824. — doi:10.1371/journal.pone.0028824 (2011).
4. Mercier P., Lewis M. J., Chang D. et al. Towards automatic metabolomic profiling of high-resolution one-dimensional proton NMR-spectra // J. Biomolecular NMR. 2011. April. Vol. 49 (3). P. 307–233.
4. Methodologies for metabolomics: experimental strategies and techniques / ed. by N.W.Lut, J.Sweedler, R.Wevers. — Cambridge; New York: Cambridge univ. press, 2013, 627 p.
5. Zerihun T. D., Farid A., Rupasr, M., Ram K. et al. The human saliva metabolome // Metabolomics. 2015. December. Vol. 11 (6). P. 1864–1883.
6. Duchemann B., Triba M. N., Guez D. et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of salivary metabolome in sarcoidosis // Sarcoidosis vasculitis and diffuse lung diseases. 2016. Vol. 33. P. 10–16.
7. Grootveld M., Silwood C. J. L., Winter W. T. High-resolution ^1H NMR investigations of the capacity of dentifrices containing a «smart» bioactive glass to influence the metabolic profile of and deliver calcium ions to human saliva // J. Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2009. №91B (1). P. 88–101.
8. Chan W., Banks R., Lynch E., Grootveld M. High-resolution ^1H NMR investigation of the oxidative consumption of salivary biomolecules by a tooth-whitening formulation: relevance to safety issues // Adv.in chem. eng. and science. 2012. №2. P. 62–73.
9. Silwood C. J., Lynch E., Claxson, A. W., Grootveld M. C. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic analysis of human saliva // Journal of Dental Research. 2002. №81 (6). P. 422–427.

10. Clendinen C. S., Lee-McMullen B., Williams C. M. et al. ¹³C NMR metabolomics: applications at natural abundance // *Anal. Chem.* 2014. №86. P. 9242–9250.
11. Clendinen C. S., Pasquel C., Ajredini R., Edison A. S. ¹³C NMR metabolomics: INADEQUATE network analysis // *Anal. Chem.* 2015. №87 (11). P. 5698.5706.
12. Lester D. The concentration of apparent endogenous ethanol // *Quart. J. Stud. Alcohol.* 1962. №23. P. 17–25.
13. Березина Т. Н. Реакции человека на представление образа спиртного // *Психология. Журнал высшей школы экономики.* 2008. №4 (5). С. 102–111.
14. Berezina T. N. Reakcii cheloveka na predstavlenie obraza spirtnogo. // *psihologiya // Zhurnal vysshej shkoly ekonomiki.* 2008. №4 (5). С. 102–111.
15. Бескаравайный П. М., Молчанов М. В., Сусликов А. В. и др. ЯМР-исследования биологических жидкостей человека для выявления патологий // *Биомедицинская химия.* 2015. №61. Вып. 1. С. 141–149.
16. Вавилова Т. П., Янушевич О. О., Островская И. Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. — М.: Бином, 2014. — 312 с.
17. Основы молекулярной ораломии / под ред. Вавиловой Т. П. — М.: МГМСУ им. А.И. Евдокимова, 2015. — 98 с.
18. Перевошикова О. А. Применение пробиотиков в комплексном лечении хронических воспалительных заболеваний пародонта на фоне соматической патологии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2013. — 22 с.
19. Митронин А. В., Прокопов А. А., Сребная Е. А., Привалов В. И. Предварительное изучение ротовой жидкости методом ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии // *Эндодонтия today.* 2016. №3. С. 3–7.
20. Митронин А. В., Прокопов А. А., Сребная Е. А., Привалов В. И. Предварительное изучение ротовой жидкости методом ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии // *Эндодонтия today.* 2016. №3. С. 3–7.

ВЫБОР МЕТОДА ЭНДОДОНТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ И РЕСТАВРАЦИИ ЗУБОВ



Заявка по учебному мероприятию представлена в Комиссию по оценке учебных мероприятий и материалов на соответствие установленным требованиям для НМО.

Лекторы: **КОРЧАГИНА Виктория Васильевна**

Даты проведения: **20–21 мая 2017 г.**

Количество мест: **до 24 человек**

Место проведения: **г. Москва**

Цена: **от 10 000 до 20 000 руб.**

Программа курса:

1-й день

Эндодонтическое лечение временных и постоянных зубов.

1. Влияние морфологических, клинических и патофизиологических особенностей зубов у детей и подростков на выбор метода эндодонтического лечения и реставрации.

2. Метод непрямого и прямого покрытия пульпы; метод витальной ампутации (парциальной, цервикальной и глубокой). Апексогенез. Химическая пульпотомия. Метод девитальной ампутации и экстирпации. Показания; противопоказания; материалы и медикаменты; факторы, влияющие на результат. Несколько слов о витальной экстирпации.

3. Антисептическое эндодонтическое лечение временных зубов. Апексофикация постоянных несформированных зубов. Инструменты и медикаменты. Способы нефармакологического воздействия. Прогноз.

4. Контрольные исследования заживления пульпы и периапикальных тканей. Протоколы лечения и наблюдения.

2-й день

Реставрация молочных и постоянных зубов.

1. Материалы, используемые в детской стоматологии для реставрации зубов: виды; классификация; преимущества применения. Обоснование выбора.

2. Методы реставрации зубов в детской стоматологии: АРТ; адгезивная реставрация; стрип-колпачки; протезирование одиночными коронками и пластиночными протезами. Показания, особенности, отдаленные результаты.

3. Способы препарирования полостей (минимально-инвазивные подходы; инструменты и оборудование). Аксессуары для реставрации.

4. Программа реабилитации, как способ повышения долговечности реставрации и результата эндодонтического лечения.

Стоимость обучения:

1 день — 12 000 руб.

2 день — 12 000 руб.

Оба дня — 20 000 руб.

Групповые дополнительные скидки:

от 2-х человек — 1000 руб. каждому;

от 3-х человек — 2000 руб. каждому.

Включены обеды, кофе-брейки, раздаточные материалы и сертификат.

АКЦИЯ! Каждый, кто при записи на курс назовет пароль «эндо», получит на курсе небольшой подарок.

Записаться на курс можно по телефонам 8-800-200-61-31 и 8-915-455-61-85 — Александр.
e-mail: seminar@stomprom.ru www.stomprom.ru