

Спектроскопия высокого разрешения ЯМР ^1H ротовой жидкости молодых пациентов с клиновидными дефектами зубов

© Митронин А.В.¹, Сребная Е.А.¹, Привалов В.И.², Прокопов А.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова» Российской академия наук, Москва, Россия

Резюме:

Цель. Сопоставление спектров ЯМР ^1H ротовой жидкости пациентов с клиновидными дефектами твёрдых тканей зубов до и после лечения.

Материалы и методы. Материалом исследования послужила слюна пациентов с клиновидными дефектами, взятая до и после лечения. В качестве метода лечения выступила реминерализующая терапия, включавшая в себя применение ополаскивателя для полости рта на основе цинк-гидроксиапатита. Методом исследования являлась спектроскопия магнитного резонанса ядер изотопа водорода-1 (^1H) образцов слюны пациентов.

Результаты. В большинстве образцов после лечения отмечалось увеличение содержание пропионовой и масляной кислот по отношению к уксусной. Общее содержание протонов водорода при этом значительно не изменилось.

Заключение. Изучение спектров магнитного резонанса ядер изотопа водорода ^1H демонстрирует распределение содержания органических кислот в ротовой жидкости до и после проведенного лечения., что позволяет оценить его эффективность.

Ключевые слова: клиновидные дефекты, метаболомика, органические кислоты, ротовая жидкость, ЯМР-спектроскопия.

Статья поступила: 05.09.2020; **исправлена:** 26.11.2020; **принята:** 29.11.2020;

Конфликт интересов: Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Для цитирования: Митронин А.В., Сребная Е.А., Привалов В.И., Прокопов А.А.. Спектроскопия высокого разрешения ЯМР ^1H ротовой жидкости молодых пациентов с клиновидными дефектами зубов. Эндодонтия today. 2020; 18(4):20-25. DOI: 10.36377/1683-2981-2020-18-4-20-25.

High resolution- ^1H NMR spectroscopy of oral liquid in young patients with wedge-shaped lesions

© A.V. Mitronin¹, E.A. Srebnaya¹, V.I. Privalov², A.A. Prokopov¹

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia

²Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract:

Aim. The comparison of saliva ^1H NMR spectra in patients with wedge-shaped lesions before and after treatment.

Materials and methods. Saliva as a study material was taken from patients with wedge-shaped lesions before and after treatment. The treatment method was remineralizing therapy that included the use of the oral rinse containing zinc-hydroxyapatite. ^1H NMR spectroscopy was chosen as an investigation method.

Results. In most cases it is noted that after treatment the content of propionic and butyric acids was on the rise in relation of acetic acid. Overall concentration of ^1H protons didn't change significantly.

Conclusions. ^1H NMR spectra analysis shows organic acid distribution in oral liquid before and after treatment, which helps to evaluate its response.

Keywords: metabolomics, NMR-spectroscopy, oral liquid, organic acids, wedge-shaped lesions.

Received: 05.09.2020; revised: 26.11.2020; accepted: 29.11.2020.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

For citation: A.V. Mitronin, E.A. Srebnaya, V.I. Privalov, A.A. Prokopov. High resolution-1H NMR spectroscopy of oral liquid in young patients with wedge-shaped lesions. *Endodontics today*. 2020; 18(4):20-25. DOI: 10.36377/1683-2981-2020-18-4-20-25.

ВВЕДЕНИЕ

В результате совершенствования спектрометров ядерного магнитного резонанса (ЯМР) многократно возросли их чувствительность и разрешающая способность. Новые возможности ЯМР используются медиками и биологами для исследования биологических жидкостей (моча, кровь, спинномозговая жидкость, сок поджелудочной железы, желчь, пот, желудочный сок, околоплодные воды) в качестве инструмента метаболического скрининга патологических изменений [1-3], что является одной из основных задач метабомики [4]. В стоматологии слюны (ротовая жидкость) в последние годы также является объектом интенсивного изучения методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения с целями формирования её общего метаболического профиля, обнаружения различных патологий на ранних стадиях их развития, исследования метаболизма, для решения прикладных задач и т.д. [5-7]. Ранее нами были изучены подходы к метаболическому профилированию слюны методом ЯМР не только на протонах, но и на ядрах ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F при сопоставлении спектров слюны здоровых людей и слюны молодых пациентов с клиновидными дефектами твёрдых тканей зубов [8-12].

В ходе исследований впервые были получены результаты, представляющие как прикладной, так и теоретический интерес. В частности, мы показали, что неорганический фосфор групп $(\text{PO}_4)_n$ слюны входит в состав структурированных жидких плёночных полимерных композиций разной толщины, причём у здоровых людей толщина плёнок больше, чем у пациентов. Уменьшение толщины биополимерной плёнки в составе слюны у пациента с выраженными клиновидными дефектами зубов хорошо согласуется с изученным химическим механизмом полиэтиологических кислотных атак [11]. Довольно неожиданным было обнаружение в ротовой жидкости пациентов присутствия трифторуксусной кислоты, сигнал которой исчез из спектров ЯМР ^{19}F после проведённого адекватного лечения [12]. Таким образом, метод ЯМР-спектроскопии показал свою высокую информативность и очевидную целесообразность его дальнейшего применения в исследованиях стоматологического профиля.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью работы было сопоставление спектров ЯМР ^1H ротовой жидкости (далее используется термин слюна) пациентов с клиновидными дефектами твёрдых тканей зубов до и после применённого лечения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования послужила ротовая жидкость пациентов с клиновидными дефектами в пределах эмали до лечения и через 1 месяц после его завершения, а также пациентов группы контроля. Возраст пациентов составлял от 18 до 30 лет. Методом лечения была выбрана комплексная реминерализующая терапия, включающая применение ополаскивателя для полости рта на основе цинк-гидроксиапатита. Схема лечения согласовывалась с инструкцией по применению и заключалась в ополаскивании полости

рта после чистки зубов 2 раза в день длительностью не более 2 минут. Курс лечения составлял 3 недели. Сбор образцов осуществлялся путем пассивного сплевывания в стерильные пробирки по строгим правилам, не допускающим попадания в исследуемые образцы посторонних включений – натошак, без предварительного применения средств гигиены полости рта, а также, исключая курение.

Методом исследования являлась спектроскопия магнитного резонанса ядер изотопа водорода-1 (^1H) образцов слюны пациентов с выраженными клиновидными дефектами зубов после проведённого лечения и контрольного образца слюны пациента без патологии данного вида. Собранные образцы слюны хранили при 290K в герметичных пластиковых пробирках с пластиковыми пробками. Для записи спектров калиброванные ЯМР-ампулы диаметром 5 мм, заполненные образцами на высоту 50-60 мм, со вставленными стеклянными капиллярами диаметром 1 мм, заполненными тяжёлой водой (D_2O), помещали в датчик спектрометра ЯМР. Сигнал дейтерия тяжёлой воды использовался для настройки однородности магнитного поля и ядерной стабилизации резонансных условий спектрометра.

Спектры высокого разрешения ЯМР ^1H записывали на спектрометре Bruker "AVANCE-300" по одноимпульсной программе с предварительным насыщением сигнала воды (программа ZGPR). Параметры записи спектров: температура пробы 300K, резонансная частота 300,21 МГц, длительность насыщающего импульса 1 с, подавление мощности насыщающего передатчика 40 dB, период следования 90-градусных импульсов 2 с, длительность возбуждающего записываемого импульса 4 мкс, число накопления сканов 160 в течение 10 мин. Все химические сдвиги δ приведены в миллионных долях (м.д.) относительно сигнала тетраметилсилана как внешнего стандарта.

Преимущества использованного метода записи спектров состоят в том, что он позволяет регистрировать слабые сигналы органических молекул слюны в присутствии сильного сигнала воды. Частота спектрометра выставляется точно на сигнал воды, перед записываемым, 90-градусным импульсом включается слабое радиочастотное поле на частоте ЯМР ^1H сигнала воды образца слюны. В течение действия этого поля (1-2 с) сигнал воды селективно насыщается и в спектре оказывается подавленным, а последующий 90-градусный записываемый импульс возбуждает ЯМР ^1H переходы сигналов органических молекул слюны.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Интерпретация спектров ЯМР индивидуальных соединений в настоящее время чаще всего является рутинным делом. Но когда речь идёт о сложной смеси, тем более о биологической жидкости, формируется спектр значительно более трудно разрешимый и несущий большое количество избыточной информации. Поэтому, хотя в предыдущих работах [8-10] отнесение наиболее существенных сигналов осуществлялось на основании общепринятого ана-

лиза химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия, для большей достоверности одновременно со спектрами ЯМР ^1H слюны мы сняли и спектры чистых соединений, присутствие которых мы позиционировали на основе отнесения соответствующих сигналов.

Сравнение спектров во всех случаях подтвердило правильность сделанного нами отнесения сигналов. На рис. 1, 2 приведены в качестве примера спектры слюны в сопоставлении со спектрами уксусной кислоты и этилового спирта. Как однозначно следует из рис. 1, ротовая жидкость пациента после лечения содержит уксусную кислоту, присутствие которой было показано и у этого же пациента до лечения, и у здорового человека [8, 9]. Заслуживает внимания и тот факт, что образец № 2 слюны пациента устойчиво содержит этиловый спирт и до, и после лечения, как и контрольный образец, взятый у здорового человека, что показано на рис. 2.

На рис. 3 приведены спектры ЯМР ^1H слюны тех же четырёх пациентов, у которых были обнаружены клиновидные дефекты зубов в начальной стадии [8,9] и которые прошли курс реминерализующей терапии. Сопоставление спектров ЯМР ^1H ротовой жидкости пациентов с клиновидными дефектами твёрдых тканей зубов до и после применённого лечения показывает, что в целом общая картина спектров меняется незначительно.

Типичная картина изображена на рис. 4, где приведены спектры образца слюны № 1 до и после лечения. Спектры содержат отчётливые сигналы уксусной, пропионовой и масляной кислот, но, что важно, несколько различающиеся по интенсивности.

По нашему мнению целесообразно остановиться на рассмотрении количественной стороны содержания именно этих кислот, несмотря на то, что имеет-

ся возможность получения значительно более подробного спектра ЯМР ^1H , отражающего присутствие минорных компонентов ротовой жидкости, многие из

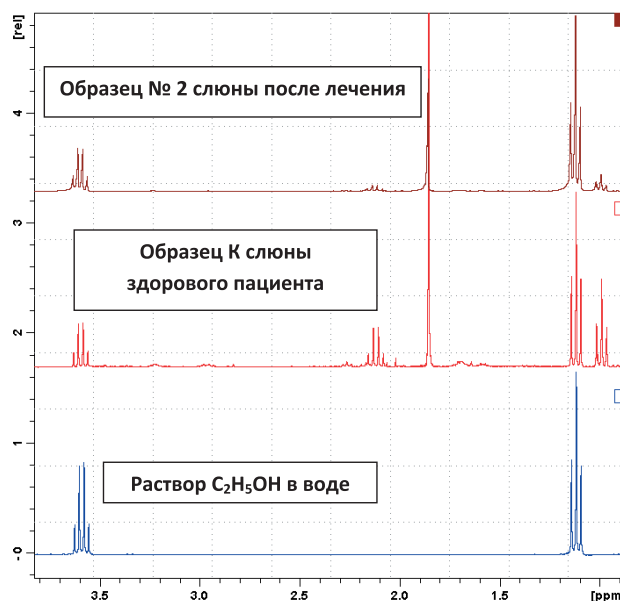


Рис. 2. Спектры ЯМР ^1H с широкополосным подавлением протонов (программа ZGPR) водного раствора этилового спирта, образца К слюны здорового пациента и образца № 2 слюны после лечения пациента

Fig. 2. NMR ^1H spectra with a broadband suppression of protons (ZGPR set) in aqueous solution of ethyl alcohol, K-specimen of a healthy patient's saliva and #2 specimen of patient's oral liquid after treatment

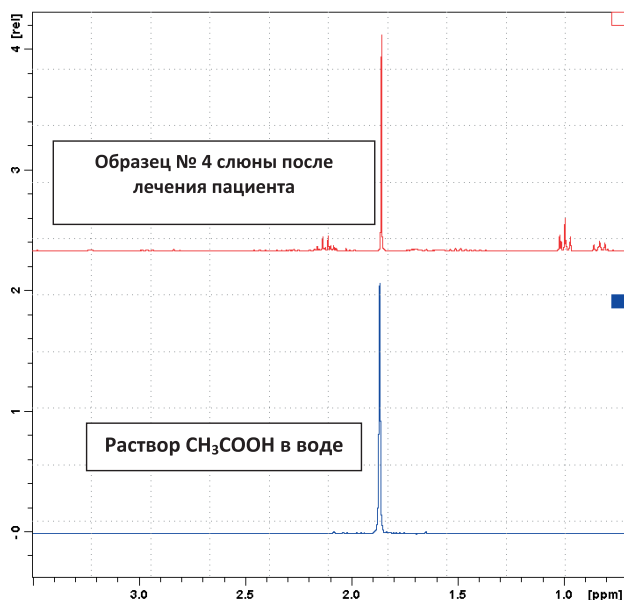


Рис. 1. Спектры ЯМР ^1H с широкополосным подавлением протонов (программа ZGPR) водного раствора уксусной кислоты и образца № 4 ротовой жидкости после лечения пациента

Fig. 1. NMR ^1H spectra with a broadband suppression of protons (ZGPR set) in aqueous solution of acetic acid and #4 specimen of patient's oral liquid after treatment

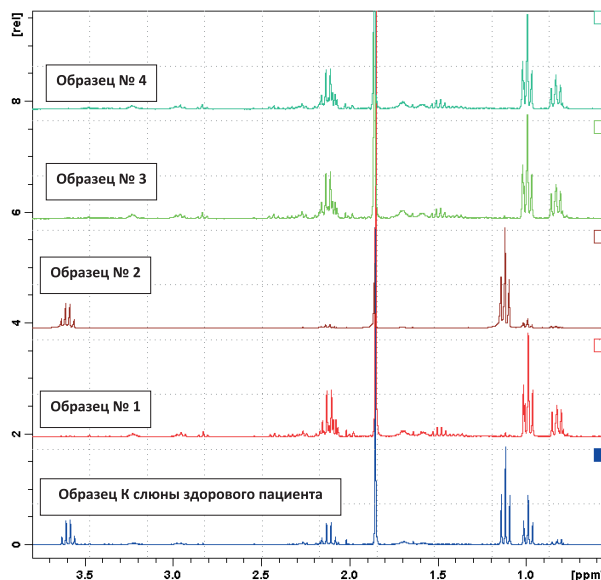


Рис. 3. Спектры ЯМР ^1H с широкополосным подавлением протонов (программа ZGPR) контрольного образца и образцов №№ 1-4 слюны после лечения пациентов

Fig. 3. NMR ^1H spectra with a broadband suppression of protons (ZGPR set) of control specimen and #1-4 specimens of patient's oral liquid after treatment

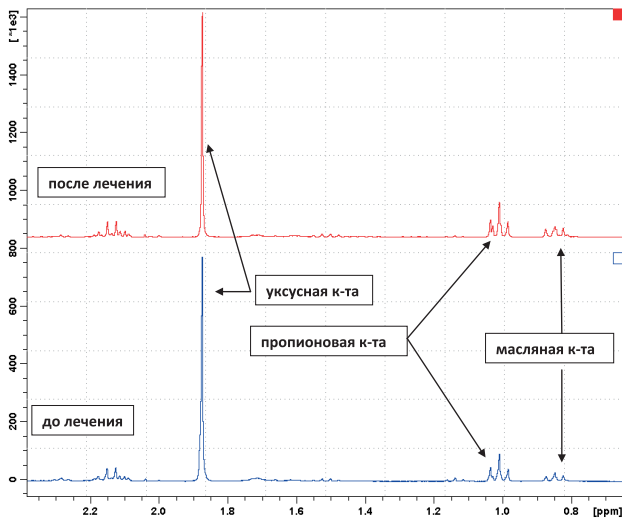


Рис. 4. Спектры ЯМР ¹H с широкополосным подавлением протонов (программа ZGPR) образца № 1 слюны до и после лечения пациента

Fig. 4. NMR ¹H spectra with a broadband suppression of protons (ZGPR set) of #1 specimen of patient's oral liquid before and after treatment

которых в силу естественных причин носят случайный характер.

На рис. 5 представлен спектр образца № 4 после лечения пациента, полученный в течение десяти часов с числом накоплений сканов 10000. Этот спектр даёт представление о возможной максимальной чувствительности определения сигналов органических молекул в образцах слюны, поскольку кроме основных сигналов в спектре ЯМР ¹H данного образца наблюдаются ещё ряд слабых сигналов органических молекул. Метаболомический анализ таких высокоинформативных спектров представляет собой самостоятельный интерес в плане более полной диагностики организма, выявления групп риска пациентов, предрасположенных к различным заболеваниям, отслеживания реакций организма на воздействия патогенов, токсических веществ, лекарственных препаратов и т.д. [1].

Как было показано ранее [8], интегральная интенсивность сигналов протонов низкомолекулярных органических соединений соответствует суммарной концентрации органических молекул в слюне в диапазоне 0,001-0,01 моль/л. Полученные нами спектры ЯМР ¹H содержат надёжно идентифицированные сигналы, это даёт возможность сопоставить их интегральные интенсивности и установить количественное соотношение основных органических молекул в ротовой жидкости. Эта информация представляет особый интерес, поскольку спектры ЯМР ¹H до и после лечения не претерпели принципиальных измене-

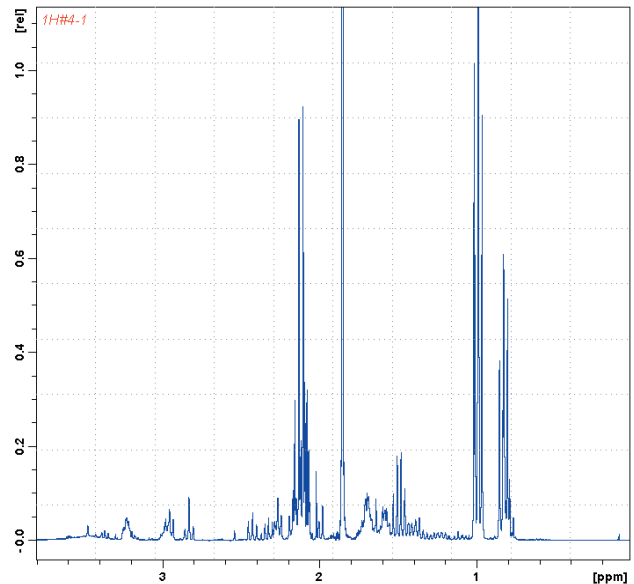


Рис. 5. Спектр ЯМР ¹H с широкополосным подавлением протонов (программа ZGPR) образца № 4 слюны после лечения пациента с числом накопления сканов NS = 10000 (накопление в течение 10 час)

Fig. 5. NMR ¹H spectrum with a broadband suppression of protons (ZGPR set) of #4 specimen of patient's oral liquid after treatment with the number of scan cumulation NS = 10000 (cumulation at 10 hours)

ний, но указывают на изменение своих количественных характеристик.

Принимая в спектрах интегральную интенсивность синглета CH₃-группы уксусной кислоты за единицу, мы получили относительные интегральные интенсивности триплетных сигналов CH₃-групп карбоновых кислот и этилового спирта. Количественные соотношения основных низкомолекулярных органических соединений в составе слюны до и после лечения приведены в таблице 1.

Как следует из данных таблицы, практически во всех случаях после лечения у пациентов в слюне значительно выросло содержание пропионовой и масляной кислот по отношению к уксусной кислоте. Исключение составляет образец № 2, в котором кроме масляной кислоты обнаружен и этиловый спирт, а содержание

Таблица 1. Относительное содержание уксусной, пропионовой, масляной кислот и этилового спирта в слюне до и после лечения.

Table 1. Abundance of acetic, propionic, butyric acids and ethyl alcohol in saliva before and after treatment.

№ образца		Уксусная к-та CH ₃ COOH	Пропионовая к-та CH ₃ CH ₂ COOH	Масляная к-та CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	Этиловый спирт CH ₃ CH ₂ OH
1	до лечения	1	0,29	0,14	0
	после лечения	1	0,42	0,23	0
2	до лечения	1	0,32	0,14	1,66
	после лечения	1	0,43	0,16	3,32
3	до лечения	1	0,20	0,04	0
	после лечения	1	0,42	0,16	0
4	до лечения	1	0,31	0,09	0
	после лечения	1	0,43	0,24	0

масляной кислоты практически не изменилось. Как известно, этанол нарушает естественные метаболические процессы в организме, что показано и для карбоновых кислот [13], это обстоятельство объясняет наблюдаемое отклонение.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в результате лечения в составе слюны произошло перераспределение количественного состава низкомолекулярных органических кислот от более сильных электролитов (муравьиная, трифторуксусная) в сторону более слабых (уксусная, пропионовая, масляная). При этом обращает на себя внимание то обстоятельство, что, как это было показано нами ранее [8] на основе анализа спектров ЯМР ¹H, общая концентрация ионов водорода в слюне здорового человека и пациентов с клиновидными дефектами твёрдых тканей зубов практически одинакова. С одной стороны одинаковое значение pH является иллюстрацией эффективной работы буферных систем слюны на начальных этапах

формирования патологии данного вида. С другой стороны – указывает на то, что не смещение pH ротовой жидкости в сторону более кислых значений запускает механизм развития клиновидных дефектов, а первичными факторами являются нарушения трофики пульпы и твёрдых тканей зубов. Эти нарушения являются полиэтиологичными, и в патогенезе следует искать или соматические заболевания (чаще всего желудочно-кишечный тракт, нервная и эндокринная системы), в то же время не исключены химические и физические причины или их совместное воздействие.

ВЫВОДЫ

Проведённые исследования показали, что эффективная реминерализующая терапия не приводит к уменьшению суммарного количества низкомолекулярных органических кислот в составе слюны, но обеспечивает их качественное и количественное перераспределение в сторону имманентных ротовой жидкости пропионовой и масляной кислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Колоколова, Т.Н., Сергеев Н.М., Корольков А.Ю. Количественное определение концентраций метаболитов в моче человека методом спектроскопии ЯМР ¹H. Биомедицинская химия. 2008; 54 (2):223-235.
2. Айхофф, У., Шпрауль, М., Пьотто, М. ЯМР высокого разрешения в биологических жидкостях и тканях. Учён. зап. Казан. ун-та. Сер. Физ.-матем. науки. 2012;154 (1): 23-32.
3. Kutysenko, V.P., Molchanov, M., Beskaravayny, P., et al. Analyzing and Mapping Sweat Metabolomics by High-Resolution NMR Spectroscopy. PLoS ONE. 2011; 6(12): e28824.
4. N.W.Lut, J.Sweedler, R.Wevers Methodologies for metabolomics: experimental strategies and techniques. Cambridge; New York: Cambridge univ. press, 2013: 627.
5. Z.T.Dame., F.Aziat., R. Mandal., et al. The human saliva metabolome. Metabolomics. 2015;11(6):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; 33:10-16.
7. Mikkonen, J.JW, Herrala, M., Soininen P., et al. Metabolic profiling of saliva in patients with primary Sjögren' syndrome. Metabolomics: Open Access. 2013; 3(3):128.

REFERENCES

1. Kolokolova, T.N., Sergeev N.M., Korolkov A.Yu. Quantitative determination of metabolite concentrations in human urine by ¹H NMR spectroscopy. Biomedical Chemistry. 2008; 54 (2): 223-235.
2. Eihoff, U., Spraul, M., Piotto, M. High-resolution NMR in biological fluids and tissues. Scientist. app. Kazan. un-that. Ser. Phys-math. science. 2012; 154 (1): 23-32.
3. Kutysenko, V. P., Molchanov, M., Beskaravayny, P., et al. Analyzing and Mapping Sweat Metabolomics by High-Resolution NMR Spectroscopy. PLoS ONE. 2011; 6 (12): e28824.
4. N. W. Lut, J. Sweedler, R. Wevers Methodologies for metabolomics: experimental strategies and techniques. Cambridge; New York: Cambridge univ. press, 2013: 627.
5. Z.T.Dame., F. Aziat., R. Mandal., Et al. The human saliva metabolome. Metabolomics. 2015; 11 (6): 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; 33: 10-16.
7. Mikkonen, J. JW, Herrala, M., Soininen P., et al. Metabolic profiling of saliva in patients with primary Sjögren ' syndrome. Metabolomics: Open Access. 2013; 3 (3): 128.

8. 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;14(3):3-8.
9. Митронин А.В., Прокопов А.А., Сребная Е.А., Привалов В.И. Выбор условий для ЯМР ¹H-спектроскопии ротовой жидкости в интересах метабомики. Cathedra. Кафедра. Стоматологическое образование. 2016; 58:14-17.
10. Митронин А.В., Прокопов А.А., Сребная Е.А., Привалов В.И. Возможности ЯМР ¹³C-спектроскопии высокого разрешения для метаболического анализа ротовой жидкости. Эндодонтия today. 2016; 4: 12-15.
11. Прокопов А.А., Митронин А.В., Сребная Е.А., Привалов В.И. ЯМР ³¹P-спектроскопия высокого разрешения в метаболическом анализе ротовой жидкости. Эндодонтия today. 2017;15(1):72-75
12. Митронин А.В., Сребная Е.А., Привалов В.И., Прокопов А.А. Исследование ротовой жидкости методом ЯМР ¹⁹F спектроскопии высокого разрешения. Cathedra – Кафедра. Стоматологическое образование. 2017; 62:12-15.
13. Calabrese V., Rizza V. Formation of propionate after short-term ethanol treatment and its interaction with the carnitine pool in rat. Alcohol.1999;9(2):169-176.

8. Mitronin A.V., Prokopov A.A., Srebnaya E.A., Privalov V.I. Preliminary study of the oral fluid by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. Endodontics today. 2016; 14 (3): 3-8.
9. Mitronin A.V., Prokopov A.A., Srebnaya E.A., Privalov V.I. The choice of conditions for ¹H NMR spectroscopy of the oral fluid in the interests of metabolomics. Cathedra. Department. Dental education. 2016; 58: 14-17.
10. Mitronin A.V., Prokopov A.A., Srebnaya E.A., Privalov V.I. Possibilities of high resolution ¹³C NMR spectroscopy for metabolomic analysis of oral fluid. Endodontics today. 2016; 4: 12-15.
11. Prokopov A.A., Mitronin A.V., Srebnaya E.A., Privalov V.I. High-resolution ³¹P NMR spectroscopy in the metabolomic analysis of the oral fluid. Endodontics today. 2017; 15 (1): 72- 75
12. Mitronin A.V., Srebnaya E.A., Privalov V.I., Prokopov A.A. Study of the oral fluid by ¹⁹F NMR high resolution spectroscopy. Cathedra - Department. Dental education. 2017; 62: 12-15.
13. Calabrese V., Rizza V. Formation of propionate after short-term ethanol treatment and its interaction with the carnitine pool in rat. Alcohol. 1999; 9 (2): 169-176.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

*Митронин А.В.*¹ – профессор, доктор медицинских наук, декан стоматологического факультета МГМСУ, заведующий кафедрой кариесологии и эндодонтии, Заслуженный врач РФ, ORCID ID: 0000-0002-3561-6222.

*Прокопов А.А.*¹ – профессор, доктор химических наук, заведующий кафедрой общей и биоорганической химии.

*Сребная Е.А.*¹ – ассистент, кандидат медицинских наук, ORCID ID: 0000-0003-1684-9407.

*Привалов В.И.*² – старший научный сотрудник, кандидат физико-математических наук.

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия.

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова» Российской академия наук, Москва, Россия.

AUTHOR INFORMATION:

*A.V. Mitronin*¹ – professor, Doctor of Medical Sciences, Dean of the Faculty of Dentistry, Head of the Department of cariology and endodontics, Honored Doctor of Russian Federation, ORCID ID: 0000-0002-3561-6222.

*A.A. Prokopov*¹ – professor, Doctor of Chemical Sciences, Head of the Department of general and bioorganic chemistry.

*E.A. Srebnaya*¹ – assistant, PhD, ORCID ID: 0000-0003-1684-9407.

*V.I. Privalov*² – senior research assistant, PhD.

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, Moscow, Russia.

²Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

Координаты для связи с авторами / Coordinates for communication with authors:

Сребная Е.А. / E.A. Srebnaya, E-mail: dr.srebnaya@mail.ru