

ЯМР ^{31}P -спектроскопия высокого разрешения в метаболомическом анализе ротовой жидкости

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

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

А.Е. СРЕБНАЯ, аспирант

В.И. ПРИВАЛОВ, к.физ.-мат. наук, старший научный сотрудник

*Кафедра кариесологии и эндодонтии

**Кафедра общей и биоорганической химии

ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ

***Лаборатория химии координационных полиядерных соединений

ФГБУН ИОНХ им. Н.С. Курнакова РАН

^{31}P NMR spectroscopy of high resolution in metabolomic analysis of oral liquid

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

Резюме: Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР), как один из основных инструментов метаболомики, приобретает все возрастающее значение в стоматологии и в медицине в целом. Резистентность твердых тканей зубов к деструкции имеет корреляцию с уровнем содержания соединений фосфора в слюне. 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 и сопутствующим факторам ее возникновения. Методом лабораторного исследования была выбрана спектроскопия магнитного резонанса ядра изотопа фосфора-31 (^{31}P) образцов ротовой жидкости здорового человека (контроль) и пациентов с выраженными клиновидными дефектами зубов. Полученные данные показывают, что группы $(\text{PO}_4)_n$ слюны входят в состав структурированных жидких пленочных полимерных структур разной толщины, причем для контрольного образца толщина пленок больше толщины пленок для больного пациента.

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

Abstract: Being one of the main tools in metabolomics, NMR spectroscopy has a growing importance in medicine and in dentistry. Dental hard tissue resistance to destruction has a correlation with the level of phosphorus content in saliva. 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 and to the co-factors of its occurrence. NMR spectroscopy of phosphorus isotope (^{31}P) nuclei of oral liquid samples from a healthy person (control) and patients with severe wedge-shaped lesions was chosen as a laboratory testing method. These data show that the saliva $(\text{PO}_4)_n$ -groups are the part of liquid filmic polymer structures of different thickness, with the thickness of the control sample films is greater than that of ill patients' samples.

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

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР), как один из основных инструментов метаболомики, приобретает все возрастающее значение в стоматологии и в медицине в целом [1, 7, 8, 10]. Недавно нами показаны [4, 5] возможности ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии высокого разрешения при анализе ротовой жидкости с целью ранней диагностики заболеваний стоматологического профиля невоспалительного генеза на тех этапах, когда еще отсутствуют их клинические проявления.

В ряду методов, практически важных для медицинских исследований, следует отметить и целесообразность использования в стоматологии ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{31}P . Фосфор, имеющий спиновое число $1/2$ и входящий в состав многих биомолекул, является изотопно чистым элементом, чув-

ствительность при регистрации ЯМР-спектров для этих ядер достаточно велика.

Как обоснованно считают, ротовая жидкость, находящаяся в состоянии динамического гетерогенного равновесия с твердыми тканями зуба, пересыщена фрагментами переменного по составу и сложно структурированного гидроксиапатита, в том числе и фосфат-ионами, преимущественно в виде HPO_4^{2-} , хотя и не только [2, 6]. Форма фосфат-ионов, обусловленная sp^3 -гибридизацией валентных орбиталей атома фосфора, и то обстоятельство, что их атомы кислорода в гидроксиапатите связаны с катионами кальция, способствует организации структуры апатита в виде полиэдров. Полиэдры в свою очередь образуют смыкающиеся призмы, в которых тетраэдры фосфатов формируют колонки [3]. С учетом сложности структур, включающих в свой состав соединения

фосфора, трудно себе представить, что в результате в той или иной степени протекающей дефрагментации твердой фазы фосфор переходит в ротовую жидкость только в виде гидрофосфат-ионов. Скорее всего, это более массивные блоки, включающие в себя органические фрагменты и сохраняющие в определенной мере свойства кристалличности.

Резистентность твердых тканей зубов к деструкции имеет корреляцию с уровнем содержания соединений фосфора в слюне. В этой связи представляло интерес изучение особенностей спектров ЯМР ^{31}P ротовой жидкости в норме и при патологии. К настоящему времени нам известна единственная работа [9], в которой авторы применили спектроскопию ЯМР ^{31}P для анализа секрета больших слюнных желёз — околоушных, поднижнечелюстных и подъязычных. Отмечая перспективность метода, авторы указали на значимые различия полученных спектров, которые дали им возможность аргументировано обсудить роль слюны каждой из желёз в быстрых и медленных фазах процесса минерализации.

Органические фосфаты слюны в виде фосфопротеинов, статеринов и других подобных структур в условиях спектрального анализа ЯМР ^{31}P значимых сигналов не дают вследствие своей высокой молекулярной массы и малой концентрации в слюне. В количественном отношении в составе слюны преобладает неорганический фосфор, к которому можно уверенно отнести общую картину спектра.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью работы была разработка подходов к метаболическому профилированию слюны методом ЯМР ^{31}P при сопоставлении спектров слюны здоровых людей и слюны пациентов с клиновидными дефектами твердых тканей зубов. Предполагается использование в дальнейшем метода ЯМР ^{31}P -спектроскопии для ранней диагностики и контроля эффективности проводимого лечения.

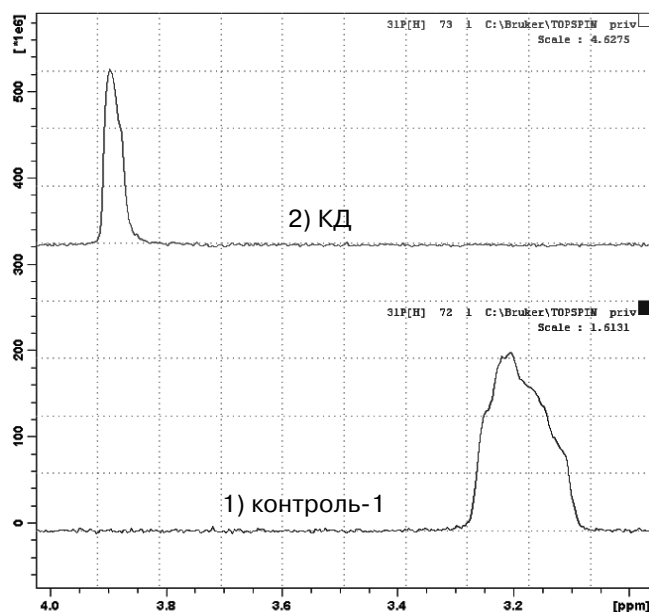


Рис. 1. Спектры ЯМР ^{31}P (121,5 МГц) с широкополосным подавлением протонов: 1) контроль-1 ($\delta = +3,2$ м.д., ширина линии на полувысоте 16,2 Гц), 2) образец КД ($\delta = +3,9$ м.д., ширина линии на полувысоте 4,2 Гц)

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На базе кафедры кариесологии и эндодонтии МГМСУ им. А.И. Евдокимова было проведено клиническое обследование пациентов, мужчин и женщин, в возрасте от 18 до 30 лет. При этом важное значение придавалось 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 утром натощак, методом 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 того, чтобы не допустить попадания частиц зубной пасты или других средств 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 исследования была выбрана спектроскопия магнитного резонанса ядер изотопа фосфора-31 (^{31}P) образцов ротовой жидкости здоровых людей (контроль) и пациентов с выраженными клиновидными

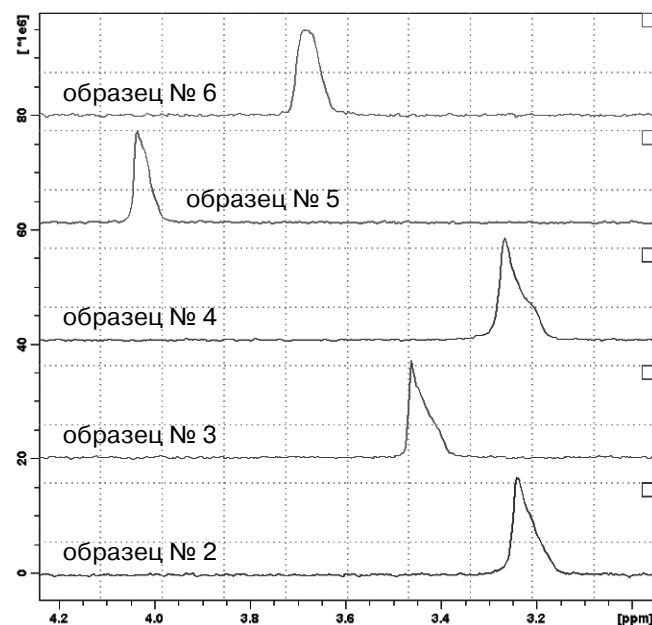


Рис. 2. Спектры ЯМР ^{31}P (121,5 МГц) с широкополосным подавлением протонов, снизу вверх: контроль-2 ($\delta = +3,24$ м.д., ширина линии на полувысоте 16 Гц), образец № 3 ($\delta = +3,46$ м.д., ширина линии на полувысоте 13 Гц), образец № 4 ($\delta = +3,27$ м.д., ширина линии на полувысоте 16 Гц), образец № 5 ($\delta = +4,04$ м.д., ширина линии на полувысоте 11 Гц), образец № 6 ($\delta = +3,68$ м.д., ширина линии на полувысоте 12 Гц)

ми дефектами зубов (КД). 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 температуре пробы 300К на спектрометре Bruker «AVANCE-300» по обычной одноимпульсной методике. Параметры записи спектров — резонансная частота 121,5 МГц, длительность импульсов возбуждения 4 мкс (30-градусный импульс), период следования импульсов 1 с, число накопления сканов — 1024. Все химические сдвиги — приведены в миллионных долях (м.д.) относительно фосфорной кислоты H_3PO_4 (85%) как внешнего стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены спектры ЯМР ^{31}P контрольного образца (контроль-1, нижний спектр) и образца КД больного пациента (верхний спектр). Спектры состоят из одного сигнала, но параметры сигналов существенно различаются. Химический сдвиг ^{31}P -сигнала контрольного образца (+3,2 м.д.) на 0,7 м.д. меньше химического сдвига сигнала ^{31}P слюны больного пациента (+3,9 м.д.). Величины химических сдвигов ^{31}P свидетельствуют о том, что атомы фосфора окружены мостиковыми атомами кислорода $(PO_4)_n$ -фрагментов. Сигналы ЯМР ^{31}P имеют вид шалашика с ширинами линий на полувысоте 16,2 Гц для контрольного образца и 4,2 Гц для образца КД больного пациента. Такая форма сигналов указывает на проявление анизотропии химического сдвига, и, что важно, это проявление в контрольном образце почти в четыре раза больше, чем в слюне больного человека.

Анизотропия химического сдвига характерна для частично ориентированных групп молекул в жидких и гель-образных средах. Таким образом, сделанное нами предположение о том, что неорганический фосфор в составе слюны находится в составе более сложных композиций, нежели HPO_4^{2-} , находит свое экспериментальное подтверждение.

Полученные данные показывают, что группы $(PO_4)_n$ слюны входят в состав структурированных жидких пленочных полимерных структур разной толщины, причем для контрольного образца толщина пленок больше толщины пленок для больного пациента. Уменьшение толщины биополимерной пленки в составе слюны у пациента с выраженными клиновидными дефектами зубов может происходить в соответствии с изученным химическим механизмом полиэтиологических кислотных атак [2]. Естественно предположить, что существующая в составе слюны пленка может выполнять и защитную функцию, ослабляемую по мере разрушения этого фактора. Деструкция пленки сопровождается образованием более мелких фрагментов, теряющих свойства частичной ориентации фосфатных групп, на что и указывает уменьшение анизотропии химического сдвига в спектре ЯМР ^{31}P больного пациента по сравнению с контрольным образцом.

Обнаружение в составе слюны пленочных структур имеет и теоретическое значение, поскольку позволяет иначе взглянуть на природу ротовой жидкости, особенно в контексте участия последней в реализации биокрибиотических свойств эмали зубов [2]. По-видимому, в составе обнаруженной пленки находятся в растворенном виде сополимеры кальций-связывающего белка эмали и гидроксиапатитов, которые по мере необходимости под влиянием некоторых факторов извлекаются из нее для участия в процессе самосборки эмали зубов.

В условиях оптимальных значений кислотности в ротовой полости повышенное содержание фосфатов отвечает высокорезистентному состоянию твердых тканей зуба. В этих условиях химическая связь фосфатных групп с кальцием, и кальция с белковыми структурами наиболее прочна, что позволяет депонировать в составе пленочного полимера такие количества фосфата и кальция, которые не могли бы сосуществовать в обычном растворе. При изменении pH в сторону более кислых значений усиливаются гидролитические процессы, и дефрагментации с соответствующими последствиями подвергаются не только кристаллическая решетка эмали, но и пленочная полимерная структура в составе ротовой жидкости.

Для оценки воспроизводимости полученных результатов исследовали в вышеуказанных условиях пять образцов слюны, один из которых от здорового человека (контроль-2) и четыре от пациентов с клиновидными дефектами зубов, выраженными в разной степени (№№3–6).

Полученные спектры ЯМР ^{31}P приведены на рис. 2. Спектры состоят из одного сигнала, параметры сигналов (химический сдвиг и ширина линии) для контрольного образца К-2 здорового человека и для образцов пациентов №№ 3–6 существенно различаются, в то время как относительные интегральные интенсивности сигналов практически одинаковы для всех образцов.

Величины химических сдвигов ^{31}P этих сигналов показывают, что атомы фосфора окружены мостиковыми атомами кислорода $(PO_4)_n$ -фрагментов гидроксиапатитных структур ротовой жидкости. Сигналы ЯМР ^{31}P также имеют вид шалашика с ширинами линий на полувысоте 11÷16 Гц для всех образцов, подтверждая проявление анизотропии электронного экранирования ядер фосфора в фосфатных группах полимерных структур слюны пациентов. Следует констатировать, что интегральная концентрация гидроксиапатитных структур в образцах слюны пациентов К-2 и №№ 3–6 практически одинакова, что указывает на перераспределение фосфорсодержащих единиц в ротовой жидкости между пленочными полимерными структурами и фрагментами их дезинтеграции, в зависимости от степени развития патологии.

Поступила 13.02.2017

Координаты для связи с авторами:

127473, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20/1

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айхофф У., Шпраул 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.

Ajhoff U., Shpraul' M., P'otto M. JaMR vysokogo razreshenija v biologicheskikh zhidkostjakh i tkanjah // Uchjon. zap. Kazan. un-ta. Ser. Fiz.-matem. nauki. 2012. T. 154. Kniga 1. S. 23–32.

2. Леонтьев В. К. Эмаль зубов как биокрибиотическая система. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. — 72 с.

Leont'ev V. K. Email' zubov kak biokiberneticheskaja sistema. — М.: GEOTAR-Media, 2016. — 72 s.

3. Литвинов С. Д. Наноразмерный композитный материал «ЛитАр» универсальный имплантат. — Самара: Книга, 2008 — 250 с.

Litvinov S. D. Nanorazmernyj kompozitnyj material «LitAr» universal'nyj implantat. — Samara: Kniga, 2008 — 250 s.

4. 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. 3–8.

Mitronin A. V., Prokopov A. A., Srebnaja E. A., Privalov V. I. Predvaritel'noe izuchenie rotovoj zhidkosti metodom ¹H i ¹³S JaMR-spektroskopii // Endodontija today. 2016. №3. S. 3–8.

5. Митронин А. В., Прокопов А. А., Сребная Е. А., Привалов В. И. Возможности ЯМР¹³C-спектроскопии высокого разрешения для метаболического анализа ротовой жидкости // Эндодонтия today. 2016. №4. С. 12–15.

Mitronin A. V., Prokopov A. A., Srebnaja E. A., Privalov V. I. Vozmozhnosti JaMR¹³S-spektroskopii vysokogo razreshenija dlja metabolicheskogo analiza rotovoj zhidkosti // Endodontija today. 2016. №4. S. 12–15.

6. Пихур О. Л. Возрастные изменения состава и строения твердых тканей зуба взрослого человека: Дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 2015.

Pihur O. L. Vozrastnye izmenenija sostava i stroenija tvjrdykh tkanej zuba vzroslogo cheloveka. Dis. ... d-ra med. nauk. — SPb., 2015.

7. 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.

8. 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.

9. Nosaka A., Fukutomy S., Uemura S. et al. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of healthy human saliva // Archives Oral Biology. 1998. Vol. 43. P. 341–346.

10. Zerihun, T. D., Farid, A., Rupasri, M., Ram, K., et al. The human saliva metabolome // Metabolomics. December. 2015. Vol. 11 (6). P. 1864–1883.

Применение микрокомпьютерной томографии в эндодонтическом исследовании

Подготовка этого материала была инициирована выступлением на XII Международном Конгрессе VDW GmbH «Революционные технологии в эндодонтическом лечении» в Москве, 29 сентября — 1 октября 2016 года уважаемого спикера Профессора Никола М. Гранде (был представлен совместный доклад с его коллегой — профессором Джанлуко Плотино, Италия).

При подготовке материала были использованы следующие источники:

1. Nicola M. Grande, Gianluca Plotino, Gianluca Gambarina, Luca Testarelli, Ferdinando D'Ambrosio, Raffaella Pecci and Rossella Bedini — «3D DENTAL ANATOMY USING MICRO-CT — THE 3 Dimensional Micro — Tomography Analysis».

2. И.С. Разина, С.Г. Семенова, А.Г. Саттаров, И.Н. Мусин «Применение микрофотографии для исследования новых материалов».

3. Васильев Ю.А. «Цифровая микрофокусная технология рентгенографии в оценке анатомического строения зубов (экспериментальное исследование)» (рукопись, экспериментальное исследование, диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук).

Представляем несколько значимых фрагментов из этих источников.

1. С помощью рентгеновского микрокомпьютерного томографа (Micro-CT), впервые разработанного в начале 1980-х годов, осуществляется неинвазивный и неразрушающий метод получения двух- и трехмерных изображений. Он позволяет получать данные с разрешением от десятков нанометров до миллиметров, причем принципы, заложенные в его создание и реализацию (инженерно-физические, конструктивные, программные и др.) — постоянно развиваются и совершенствуются.

2. Сегодня исследования с помощью микрокомпьютерной томографии — достаточно новые и универсальные. Они являются представительными методами для изучения объемного строения практически любых материалов и объектов. Результаты пространственного изучения с помощью Micro-CT могут быть как дополнительными данными к существующим традиционным показателям, так и являться поставщиком новейшей, недоступной ранее информации.

3. Сфера применения Micro-CT — от инженерии до машиностроения, от кристаллографии до нефтяной промышленности, от палеонтологии, археологии до современной геологии при исследовании горных пород, от микроэлектроники до электронной промышленности, от микробиологии до анатомии и медицины, от наноматериалов до композитов и изделий из них; при изучении биологических материалов в медицине и в других областях.

4. При помощи микрокомпьютерной томографии можно достичь разрешающей способности в несколько микрон или даже в несколько сот нанометров (micro-CT с разрешающей способностью на уровне сотен нанометров условно называется нанотомографией). Наивысшую разрешающую способность, превышающую один микрон, целесообразно применять на объектах, величина которых не превышает нескольких миллиметров. Недеструктивным методом с использованием Micro-CT исследуются внутреннее строение как органических, так и неорганических тканей, при этом программно устанавливается разрешающая способность, сопоставимая с оптическим микроскопом.

5. Сегодня исследования в стоматологии с использованием рентгеновских лучей Micro-CT очень перспективны, и в частности эти исследования являются одними из самых больших достижений в области эндодонтии.

6. Исследования с использованием рентгеновского излучения Micro-CT — это неразрушающий метод визуализации трехмерной внутренней микроструктуры объектов, выявления особенностей строения корневых каналов (перешейки, апикальные дельты, дополнительные каналы, каналы различной сложной формы — с поднутрениями, с изгибами и разветвлениями и др.). Метод аналогичен медицинской томографии, но обладает значительно более высоким пространственным разрешением. При сканировании визуализируется вся внутренняя трехмерная архитектура объекта, при этом образец полностью сохраняется для других видов исследований.

7. Micro-CT, использующий рентгеновские лучи, на данный момент своего развития не подходит для естественного клинического исследования на людях из-за радиационного воздействия; он может становиться только мощным инструментом для изучения, анализа, сравнения, обмена знаниями и рекомендаций обуча-