

Рисунок 3 – Спектры ХЛ при лакказном окислении фенолов. $[E]_0 = 50$ мг/л, цитратный буфер pH 4,6, T 308 K, а) флороглюцин: $[S]_0 = 0,1$ mM, $\lambda_{max} = 496 \pm 25$ нм; б) галловая кислота: $[S]_0 = 0,25$ mM, $\lambda_{max} = 622 \pm 12$ нм

Таким образом, изучены закономерности хемилюминесценции при лакказном окислении трехатомных фенолов и триметилгидрохинона, превращение которых характеризуется наиболее интенсивным свечением, получены экспериментальные свидетельства того, что данный процесс реализуется по радикальному механизму.

Список литературы / References:

1. Морозова О. В [и др.]. Лакказа-медиаторные системы и их использование: обзор. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2007, т. 43, с. 583-597. [Morozova O.V. Lakkaza-mediator systems and their use: a review. *Prikladnaya biochimia i mikrobiologia*, 2007, vol. 43, pp 583-597. (In Russ.)]
2. Diana M. Mate, Miguel Alcalde. Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances*, 2015, vol. 33, no. 1, pp. 25-40.
3. Досон Р. [и др.] *Справочник биохимика*. М.: Мир, 1991, 544 с. [Doson P. [et al] *Data for Biochemical Research*. М.: Mir, 1991, 544 p. (In Russ.)]
4. Roberta Re [et al.] Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol. 26. pp. 1231-1237.
5. Шендрик А.Н. [и др.] *Автоокисление фенольных антиоксидантов в водных средах: монография*. Донецк: ДонНУ, 2013, с. 39-40. [Shendrik A.N. [et al]. *Autooxidation of phenolic antioxidants in aqueous media: monograph*, Donetsk: DonNU, 2013, pp 39-40. (In Russ.)]
6. Christopher F.T. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, vol. 140, pp. 19-26.
7. Catherine H. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 2016, vol. 5, pp. 250-266.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ СЛЮНЫ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ХРОНОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ

Бельская Л.В.

Омский государственный технический университет
ул. Проспект Мира, 11, г. Омск, 644050, РФ
e-mail: Ludab2005@mail.ru

Аннотация. Приведено сопоставление биохимического состава слюны и интенсивности полос поглощения на ИК-спектрах образцов, полученных в течение суток с интервалом 3 часа. Показано, что ИК-спектры образцов, полученных в дневное и ночное время, существенно отличаются. Так, в дневное время повышается интенсивность полос, соответствующих сахарам и аминокислотным остаткам, но уменьшается интенсивность поглощения липидов и свободных аминокислот. При этом в дневное время статистически достоверно выше уровень pH и скорость саливации, однако ниже содержание белка и коэффициентов Ca/P и Na/K. Расчет коэффициентов корреляции по Спирмену подтвердил наличие корреляции между содержанием белка в слюне и интенсивностью полос поглощения, соответствующих аминокислотным остаткам и свободным аминокислотам. Таким образом, метод ИК-спектроскопии можно применять для выявления околосуточных изменений состава биологических жидкостей, в частности слюны.

Ключевые слова: слюна, инфракрасная спектроскопия, биохимический состав, околосуточная динамика

POSSIBILITIES OF APPLICATION OF IR SPECTROSCOPY OF SALIVA FOR MONITORING CHRONOPHYSIOLOGICAL FEATURES

Bel'skaya L.V.

Omsk State Technical University

Prospect Mira St., 11, Omsk, 644050, Russia

e-mail: Ludab2005@mail.ru

Abstract. A comparison of the biochemical composition of saliva and the intensity of absorption bands on the IR spectra of samples obtained during the day with an interval of 3 hours is given. It is shown that the IR spectra of samples obtained in the daytime and at night are significantly different. Thus, in the daytime, the intensity of bands corresponding to sugars and amino acid residues increases, but the intensity of absorption of lipids and free amino groups decreases. At the same time in the daytime, the pH and salivation rate are statistically significantly higher, however, the protein content and the coefficients of Ca / P and Na / K are lower. The calculation of the Spearman correlation coefficients confirmed the correlation between protein content in saliva and the intensity of absorption bands corresponding to amino acid residues and free amino groups. Thus, IR spectroscopy can be used to detect diurnal changes in the composition of biological fluids, in particular saliva.

Key words: saliva, infrared spectroscopy, biochemical composition, daily dynamics

Метод ИК-спектроскопии практически не применяется в клинической лабораторной диагностике в связи с необычайной сложностью состава и строения биологических жидкостей [1,2]. Однако в последнее время интерес исследователей привлекает слюна как перспективный объект для получения ценной диагностической информации [3,4]. Высокую скорость изменения состава слюны можно использовать для мониторинга различных биоритмов (сезонных, околосуточных, циркадианных и т.д.), что особенно важно при изучении физиологических особенностей организма человека [5].

Цель исследования – выявление особенностей околосуточной динамики состава слюны методом инфракрасной спектроскопии.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 40 здоровых добровольцев (20 мужчин, 20 женщин, возраст 23,1±0,9 лет). Пробы слюны собирали в течение суток каждые 3 часа (в 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 часа) в течение 10 минут, после чего центрифугировали при 7000 об/мин. Во всех образцах определяли pH, концентрацию ионов кальция, калия, натрия и неорганического фосфора, рассчитывали коэффициенты Ca/P и Na/K. Образцы слюны объемом 50 мкл высушивали в течение суток на подложке из селенида цинка в термостате при 37°C. ИК-спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» (СИМЕКС) в диапазоне 500-4000 см⁻¹.

Результаты и обсуждение. Типичный ИК-спектр слюны приведен на рисунке 1.

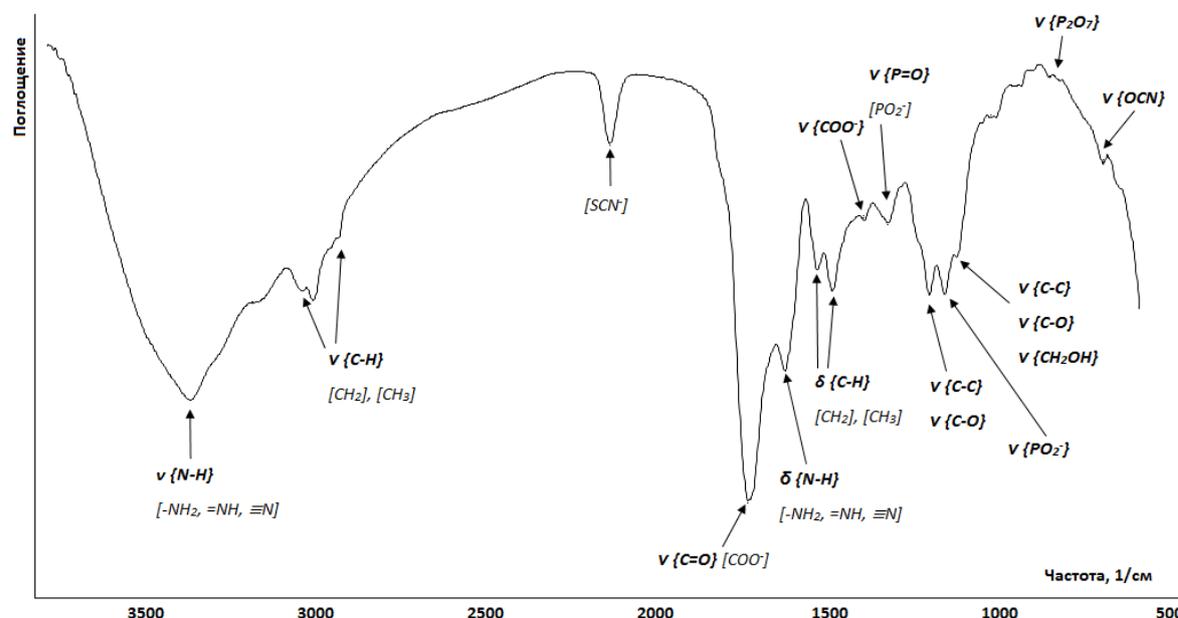


Рисунок 1 – ИК-спектр слюны

На ИК-спектре слюны можно выделить три основные группы макромолекул: липиды (3000-2800 см⁻¹), белки (1700-1600 см⁻¹ и 1560-1500 см⁻¹) и нуклеиновые кислоты (1250-1000 см⁻¹). Широкая полоса поглощения при 3273 см⁻¹ соответствует амиду А. Узкая полоса средней интенсивности при 2057 см⁻¹ относится к тиоцианатным анионам (SCN⁻). Данная полоса характерна именно для слюны и проявляется в области спектра, которая обычно

не содержит никакого пикового поглощения из биологических образцов [6]. Две узкие полосы, расположенные при 1649 см^{-1} и 1543 см^{-1} , классифицированы как полосы поглощения амида I и II, соответственно. Полоса, наблюдаемая при 1075 см^{-1} в спектрах слюны, соответствует фрагментам сахаров. Оставшиеся менее интенсивные полосы поглощения соответствуют метиленовым группам боковых цепей аминокислот в белках и липидах (1452 см^{-1}), боковых цепей аминокислот (1396 см^{-1}), амиду III /фосфолипидам ($1286\text{--}1320\text{ см}^{-1}$) и фрагментам сахаров, гликозилированных белков и фосфатным группам в нуклеиновых кислотах ($1080\text{--}950\text{ см}^{-1}$).

На следующем этапе полученные ИК-спектры были сопоставлены по интенсивности спектральных полос, соответствующих основным группам макромолекул, что позволило объединить образцы в 2 группы, собранные в дневное и ночное время (рис.2).

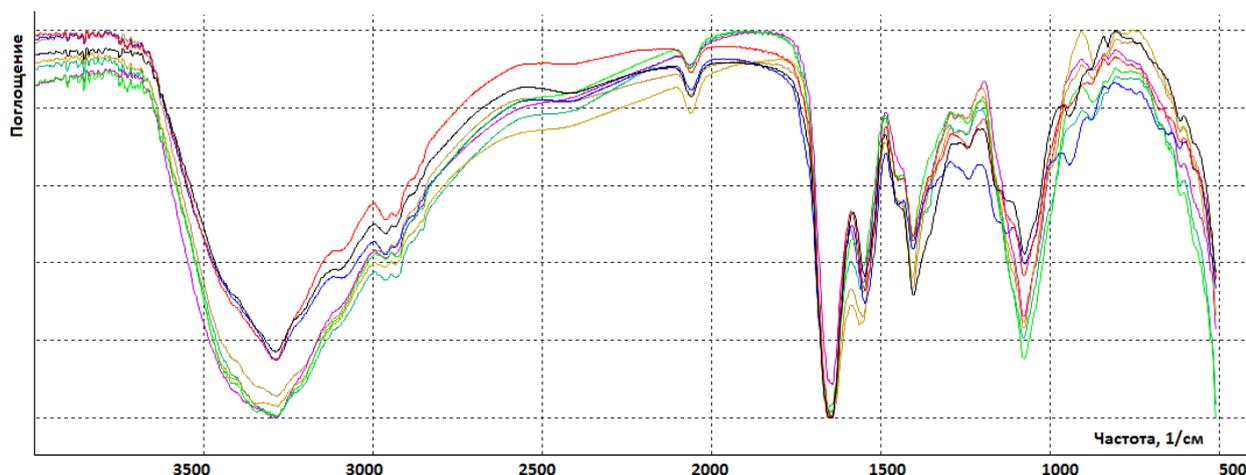


Рисунок 2 – Динамика ИК-спектров слюны в течение суток (один образец)

В соответствии с близкими характеристиками спектров все образцы были объединены в группы, для которых были рассчитаны медианы и интерквартильный размах значений биохимических параметров, а также интенсивности полос поглощения, соответствующих основным функциональным группам слюны (см. табл. 1).

Таблица 1 – Биохимический состав и интенсивность полос поглощения слюны в дневное и ночное время

Показатель		24:00-06:00	09:00-21:00	p-value
рН		6,52 [6,49; 6,62]	7,00 [7,00; 7,01]	0,0245
Общий белок, мг/л		0,86 [0,78; 1,21]	0,35 [0,31; 0,41]	0,0526
Скорость саливации, мл/мин		0,74 [0,45; 0,77]	1,10 [1,04; 1,25]	0,0213
Са/Р		0,311 [0,254; 0,416]	0,267 [0,217; 0,351]	0,6547
Na/К		1,059 [0,840; 1,309]	0,622 [0,531; 0,634]	0,0271
Интенсивность, %	1075 см^{-1}	25,5 [13,8; 42,3]	63,1 [61,5; 68,1]	0,0154
	1243 см^{-1}	3,9 [2,6; 5,3]	3,0 [1,6; 3,5]	0,1797
	1403 см^{-1}	17,5 [14,7; 40,2]	24,2 [14,5; 33,2]	0,6547
	1547 см^{-1}	27,2 [23,9; 29,0]	47,6 [32,0; 50,9]	0,0253
	1648 см^{-1}	60,6 [15,0; 65,1]	51,3 [32,6; 59,9]	0,4561
	2060 см^{-1}	6,9 [6,1; 7,9]	6,2 [4,4; 6,3]	0,2967
	2963 см^{-1}	2,6 [2,2; 2,6]	1,2 [0,6; 1,6]	0,0339
	3287 см^{-1}	19,2 [16,9; 36,9]	14,7 [12,6; 15,3]	0,0353

Показано, что в дневное время статистически достоверно выше уровень рН и скорость саливации, однако ниже содержание белка и коэффициентов Са/Р и Na/К. Естественно предположить, что динамика концентрации электролитных компонентов слюны в большей степени обусловлена изменением скорости саливации в течение суток [7-9]. Однако расчет коэффициентов корреляции по Спирмену подтвердил только существование положительной корреляционной связи средней силы между скоростью саливации и рН ($R=0.4978$, $p<0.05$) и отрицательной корреляции между скоростью саливации и уровнем натрия ($R=-0.5206$, $p<0.05$). Тем не менее показано, что концентрация кальция и неорганического фосфора находится в обратной зависимости от величины рН слюны ($R=-0.5776$ и $R=-0.6913$ для кальция и фосфора соответственно). Данный факт можно объяснить увеличением растворимости фосфатов кальция при уменьшении кислотности среды. Учитывая неоднозначный

характер околосуточной динамики концентрации кальция и неорганического фосфора, удобнее рассматривать динамику Са/Р-коэффициента. Показано, что наблюдается две волны Са/Р-коэффициента с максимумами в 7-8 часов утра и 18-19 часов вечера. Минимальные значения минерализующего потенциала слюны соответствуют 14-15 часам дня и полуночи. Таким образом, максимумы Са/Р-коэффициента приходятся на периоды изменения скорости саливации: ее резкого увеличения в утренние часы и снижения в вечерние, что может быть связано с дополнительной стимуляцией поступления ионов кальция и фосфора из слюнных желез. Тогда как в периоды стабильной секреции вероятно возрастает доля ионов, поступающий в слюну за счет растворения фосфатов кальция зубной эмали. Для коэффициента Na/K наблюдается один максимум, соответствующий 3 часам ночи, и минимум в 12-13 часов дня. При этом динамика коэффициента Na/K находится в противофазе со скоростью саливации слюны, что обусловлено более существенным вкладом динамики уровня натрия в значения данного коэффициента ($R=0.9000$, $p<0.05$). По-видимому, скорость поступления ионов натрия через гематосаливарный барьер постоянна и увеличение скорости секреции приводит к разбавлению и как следствие, к снижению концентрации натрия.

Выявленные особенности биохимического состава слюны подтверждаются изменениями, наблюдаемыми на ИК-спектрах образцов. Так, в дневное время повышается интенсивность полос, соответствующих сахарам (1075 см^{-1}) и аминокислотным остаткам (1547 см^{-1}), но уменьшается интенсивность поглощения липидов слизистой оболочки полости рта (2963 см^{-1}) и свободных аминогрупп (3287 см^{-1}). Расчет коэффициентов корреляции по Спирмену подтвердил наличие корреляции между содержанием белка в слюне и интенсивностью полос поглощения при 1547 и 3287 см^{-1} ($R=0,7153$; $p=0,05$). Можно предположить, что увеличение интенсивности полос поглощения, характерных для сахаров и аминокислот, связано с поступлением данных веществ из пищи, тогда как липиды в большей степени поступают в слюну из клеточных мембран слизистой оболочки полости рта под влиянием жизнедеятельности микрофлоры в ночное время.

Таким образом, показано, что метод ИК-спектроскопии можно применять для выявления околосуточных изменений состава биологических жидкостей, в частности слюны. Перспективным является сопоставление результатов аминокислотного анализа слюны с данными ИК-спектроскопии для получения более полной информации об околосуточной динамике и физиологических особенностях организма человека.

Список литературы / References:

1. Гордечов А.С. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей и тканей. *Современные технологии в медицине*, 2010, № 1, с. 84-98. [Gordetsov A.S. Infrared spectroscopy of biological fluids and tissues. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine*, 2010, vol. 1, pp. 84-98. (In Russ.)]
2. Orphanou C.-M. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic Science International*, 2015, vol. 252, pp. 10-16.
3. Зубарева Г.М., Микин В.М., Бордина Г.Е., Беляева И.А., Лопина Н.П., Зубарев С.М., Каргаполов А.В. Инфракрасная спектрометрия в изучении ротовой жидкости для диагностических целей. *Стоматология*, 2009, № 5, с. 7-10. [Zubareva G.M., Mikin V.M., Bordina G.Ye., Belyayeva I.A., Lopina N.P., Zubarev S.M., Kargaplov A.V. Infrared spectrometry in the study of oral fluid for diagnostic purposes. *Stomatologiya*, 2009, vol. 5, pp. 7-10. (In Russ.)]
4. Seredin P., Goloshchapov D., Kashkarov V., Ippolitov Y., Bambery K. The investigations of changes in mineral-organic and carbon-phosphate ratios in the mixed saliva by synchrotron infrared spectroscopy. *Results in Physics*, 2016, vol. 6, pp. 315-321.
5. Aubin S., Kupers R., Ptito M., Jennum P. Melatonin and cortisol profiles in the absence of light perception. *Behavioural Brain Research*, 2017, vol. 317, pp. 515-521.
6. Rodrigues L.M., Magrini T.D., Lima C.F., Scholz J., da Silva Martinho H., Almeida J.D. Effect of smoking cessation in saliva compounds by FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017, vol. 174, pp. 124-129.
7. Inoue H., Ono K., Masuda W., Inagaki T., Yokota M., Inenaga K. Rheological properties of human saliva and salivary mucins. *J. Oral Biosciences*, 2008, vol. 50, no. 2, pp. 134-141.
8. Ferguson D.B., Botchway C.A. A comparison of circadian variation in the flow rate and composition of stimulated human parotid, submandibular and whole salivas from the same individuals. *Archives of oral biology*, 1980, vol. 25, pp. 559-568.
9. Dawes C. Circadian rhythms in the flow rate and composition of unstimulated and stimulated human submandibular saliva. *J Physiol*, 1975, vol. 244, pp. 535-548.