

MEDICAL JOURNAL

Volume 1, No. 1

Pages 1-214

December 5, 2022

Vol. 1 No. 1 December 5,2022

MedUnion



Tashkent State Dental Institute

Tashkent, Uzbekistan

E- ISSN 2181-3183

18. Нуров А.Р., Реймназарова Г. Д.
Молекулярные основы развития хронических колитов как предрака толстой кишки.....112-115
19. Очилова М.У., Толипова М.А., Алиева Н.М.
Современные взгляды на заболевания височно-нижнечелюстного сустава (литературный обзор).....116-126
20. Расулов Х.К., Баймаков С.Р.
Особенности развития синдрома энтеральной недостаточности при остром панкреатите.....127-133
21. Раупова Н.Ш., Хайдарова Д.К.
The role of neuropeptides and treatment in the acute period of ischemic stroke.....134-138
22. Рахимов З.К., Курбанова С.Ю., Якубова Н.А., Турдиев П.К.
Species composition of microorganisms in lower jaw fractures in surveyed patients.....139-143
23. Рихсиева Д. У., Салимов О.Р.
Биохимическое исследование слюны у женщин в период лактации.144-148
24. Рузматов К. М., Шамсиев Д.Ф.
Ҳиқилдоқнинг сурункали чандиқли торайиши бўлган беморларни даволашда баллон дилатация ва маҳаллиқ гормонотерапия қўллашнинг аҳамияти.....149-154
25. Рустамова С.М., Зиятова Г.З., Хаджиметов А.А., Мамадрахимов А.А.
Газохроматографическое определение свободных жирных кислот в ротовой жидкости как индикаторы состояния организма.....155-162
26. Сайдалихужаева Ш.Х., Рустамова Х.Э.
Motivation and satisfaction with the professional activities of nurse anesthetists.....163-169
27. Туймачев У. А., Ашуров Т. А.
Антропометрические параметры грудной клетки детей школьного возраста сельских районов ашкентской области.....170-174
28. Фазылова Л.Г., Алимова Д.М.
Оптимизация лечения больных с хроническим генерализованным пародонтитом после перенесенного коронавирусной инфекцией Covid- 19.....175-182
29. Хаджиметов А.А., Дусмухамедова А. М., Туйчибаева Д. М., Хаджиметов А.А.
Значение бессимптомной гиперурикемии в механизме развития гипертонической ретинопатии.....183-192
30. Хикматов М.Н.
Применение магнитной стимуляции в эффективном лечении больных с травматической оптической нейропатии.....193-197
31. Хикматов М.Н.
Эффективность лечения травматической оптической нейропатии с использованием метода цветовой и магнитной стимуляции.....198-201
32. Шерназаров О. Н., Вохидов У. Н.
Ҳиқилдоқнинг сурункали паралитик торайиши бўлган беморларни жарроҳлик даволашда лазержарроҳликнинг самарадорлигини баҳолаш202-207
33. Babakulov Sh., Baymakov S., Boltaev Sh, Yunusov S, Hodiev H
The use of probiotics in the complex treatment of bladder cancer.....208-214

УДК 616-008.87-073:543.42.062

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ КАК ИНДИКАТОРЫ СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА

¹Рустамова С.М., ¹Зиятова Г.З., ¹Хаджиметов А.А., ²Мамадрахимов А.А.

¹Ташкентский Государственный стоматологический институт,

¹Институт биорганической химии АН РУз

Резюме

Целью настоящей работы являлась разработка способа подготовки образцов к анализу газовой хроматографии с масс-селективным детектированием позволяющего проводить определение КЖК в ротовой жидкости у здоровых лиц и больных хроническим генерализованным пародонтитом. В исследование были включены 18 больных со средней степенью хронической генерализованной пародонтитом в возрасте от 28 лет до 61 года. Использован газовых хроматограф с масс-спектрометрией Agilent 5977B GC-MSD, масс-детектор Agilent 8890 GC. Применялись колонки HP-5MS Ultra inert 30 м × 250 мкм × 0,25 мкм. В ходе исследования ротовой жидкости у больных ХГП с использованием ГХ/МС выявлено изменение абсолютного содержания короткоцепочечных жирных кислот. Выявлено снижение уровня уксусной кислоты до $0,26 \pm 0,02$ мг/г., пропионовой кислоты до $0,07 \pm 0,006$ мг/г, и масляной кислоты до $0,013 \pm 0,002$ мг/г. в ротовой жидкости пациентов с ХГП средней степени.

Ключевые слова: свободные жирные кислоты, хронический генерализованный пародонтит, газовая хроматография с масс спектрометрией (ГХ-МСД).

Хулоса

Ушбу илмий ишнинг мақсади соғлом одамлар ва сурункали тарқалган пародонтит (СТП) билан оғриган беморларда оғиз суюқлигидаги қисқа занжирли ёғ кислоталарини аниқлаш имконини берадиган газ хроматографияси-масс спектрометрияси (ГХ-МСД) орқали таҳлил қилиш учун намуналар тайёрлаш усулини ишлаб чиқишни такомиллаштиришдан иборат. Тадқиқотимизда 28 ёшдан 61 ёшгача бўлган сурункали тарқалган периодонтит касаллигининг ўртача даражаси билан оғриган 18 нафар бемор иштирок этди. Тадқиқот давомида Agilent 8890 GC масс-спектрометриясига эга Agilent 5977B GC/MSD газ хроматографидан фойдаланилган. ҲП-5МС Ультра инерт 30 м × 250 мкм × 0,25 мкм устунлар ишлатилган. Г-МСД дан фойдаланган ҳолда СТП билан оғриган беморларда оғиз суюқлигини ўрганиш жараёнида қисқа занжирли ёғ кислоталарининг мутлақ таркибидаги ўзгаришлар аниқланди. Ўртача СТП бўлган беморларнинг оғиз суюқлигида сирка кислотаси даражасининг $0,26 \pm 0,02$ мг/г гача, пропион кислотаси $0,07 \pm 0,006$ мг/г гача, бутир кислотанинг $0,013 \pm 0,002$ мг/г гача пасайиши аниқланди.

Калит сўзлар: эркин ёғ кислоталари, сурункали тарқалган пародонтит (СТП), масса спектрометрияли газ хроматографияси (ГХ-МСД).

Summary

To develop a method for preparing analysis samples by gas chromatography with mass-selective detection was the purpose of this work, which makes it possible to determine SCFA in oral fluid in healthy individuals and patients with chronic generalized periodontitis (CGP). The research included 18 patients with an average degree of chronic generalized periodontitis aged 28 to 61 years. An Agilent 5977B GC/MSD gas chromatograph with mass spectrometry an Agilent 8890 GC mass detector were used. HP-5MS Ultra inert 30 m × 250 mkm × 0.25 mkm columns were used. During the study of the oral fluid in patients with CGP using GC-MS, a change in the absolute content of short chain fatty acids was revealed. A decrease in the level of acetic acid to 0.26 ± 0.02 mg/g, propionic acid to 0.07 ± 0.006 mg/g, and butyric acid to 0.013 ± 0.002 mg/g was revealed in the oral fluid of patients with moderate CGP.

Keywords: free fatty acids, chronic generalized periodontitis (CGP), gas chromatography with mass spectrometry (GC-MSD).

Введение

В настоящее время полость рта рассматривается как комплексная экологическая система, в которой внешние факторы теснейшим образом взаимодействуют с внутренними (слизистая оболочка, пародонт, бактериальное сообщество, локальная иммунная система, слюна). Поэтому, изучение свойств ротовой жидкости (РЖ) вызывает интерес не только у стоматологов, но и у врачей других специальностей, так как, ротовая жидкость представляет собой среду, в которой органы полости рта находятся на протяжении всей жизни и которые являются факторами поддержания гомеостаза организма.

Исследование профиля РЖ - одно из ключевых направлений в ранней диагностике заболеваний зубочелюстной системы организма. РЖ могут служить биомаркерами ранних стадий развития различных патологий ротовой полости. Подробное исследование статуса РЖ в динамике может быть весьма полезно не только при диагностике заболеваний, но и для оценки эффективности лекарственной терапии. Основной метод анализа

состава РЖ - это газовая хроматография (ГХ) с пламенно-ионизационным детектированием, однако, в сочетании с масс-спектрометрией, метод ГХ имеет ряд неоспоримых преимуществ как в части надежности идентификации аналитов, так и чувствительности и селективности их определения. При этом, определение свободных жирных кислот в ротовой жидкости методом ГХ после переэтерификации в метиловые эфиры может рассматриваться в качестве классического подхода.

В настоящее время, генерализованный пародонтит можно отнести не только к важной медицинской, но и к социальной проблеме в связи с его негативным влиянием не только на органы полости рта, но и на весь организм в целом. Многочисленными исследователями выявлен факт, что одну из главных ролей в возникновении воспаления пародонта играет инфекционный фактор, к которому следует отнести патогенную микрофлору, вегетирующую на зубах и десне, продукты её жизнедеятельности, токсины и эндотоксины, микробные ферменты. Среди прочих биологически активных веществ самым

неоднозначным продуктом жизнедеятельности анаэробных бактерий можно считать короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК), которые не только отражают активность микрофлоры в полости рта, но также обладают самостоятельным провоспалительным действием. КЖК участвуют в микроциркуляции, регуляции ионного обмена, секреции слизи, влияют на адгезию и размножение патогенной и условнопатогенной флоры, активируют местный иммунитет, фагоцитоз, восполняют энергетические потребности различных тканей, в первую очередь эпителия, влияют на пролиферацию и дифференцировку эпителиоцитов. Известно также, что различные КЖК продуцируются микрофлорой определенных родов. Аэробные микроорганизмы (*Escherichia coli*, стрепто- и стафилококки) являются продуцентами уксусной кислоты и изоокислот; анаэробные микроорганизмы — бактерии рода *Bacteroides* и др.— пропионовой кислоты; бактерии рода *Clostridium* и *Fusobacterium* и др.— масляной кислоты. Становится очевидным, что данные микробные метаболиты имеют определенную диагностическую ценность, позволяя судить о качественном и количественном характерах микрофлоры, функциональном состоянии системы (органа) и могут служить отображением различных процессов, происходящих в полости рта.

Целью настоящей работы являлась разработка способа подготовки образцов к анализу газовой хроматографии с масс-селективным детектированием позволяющего проводить определение КЖК в ротовой жидкости у здоровых лиц и больных

хроническим генерализованным пародонтитом.

Материал и методы исследования

В исследование были включены 18 больных со средней степенью хронической генерализованной пародонтитом в возрасте от 28 лет до 61 года, обратившихся в клинику ТГСИ. Диагностика заболеваний пародонта базировалась на основании общепринятых клинических, индексных критериев и включала: определение глубины пародонтальных карманов, характера экссудата, патологической подвижности зубов, зубных отложений, степени кровоточивости, индекса гигиены (ГИ, Green J.C., Vermillion J.R., 1960)), папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса (РМА, Parma C., 1960), пародонтального индекса (ПИ, Russel A., 1956). Верификацию диагноза-хронический генерализованный пародонтит осуществляли на основании клинических (данных анамнеза, жалоб и стоматологического исследования) и инструментальных методов исследования при участие профессора кафедры терапевтической стоматологии ТГСИ Камилова Х.П. В данной ситуации у больных ХГП отмечено гиперемия, отечность десен, кровоточивость их при зондировании, обнаруживались пародонтальные карманы, средние показатели глубины составили 5 мм. Зубы имели первую или вторую степень подвижности. Отмечалось обилие над- и поддесневых минерализованных зубных отложений. Средние значения ИГ были равны $1,83 \pm 0,11$, индекса РМА - $44,65 \pm 2,37$, ПИ - $2,27 \pm 0,19$. В группу сравнения были включены 12 пациентов без патологии пародонта. В исследование не включали по следующим критериям; при наличии у участника исследования

заболеваний печени, ССС, ЖКТ, заболеваний мочевыводящей системы, эндокринной системы, беременность, прием препаратов, которые влияют на липидный обмен. Исследование короткоцепочечных жирных кислот в ротовой жидкости проводили методом газовой хроматографии. Способ определения короткоцепочечных жирных кислот (уксусной С₂, пропионовой С₃, масляной С₄, с изомерами) включал: процесс пробоподготовки и газохроматографический анализ. Эталонами работы были коммерческие наборы кислот-С₂, С₃, С₄, изо-масляная, изовалериановая, капроновая и изо-капроновая кислоты. Состав КЖК ротовой жидкости определяли однократно, натощак, при первичном обследовании. Ротовую жидкость отбирали в эппендорфы и хранили до анализа в морозильной камере при -80°C. Перед исследованием, ротовую жидкость центрифугировали при 14000 об/мин. В течение 20 минут. Для выделения липидов, лиофилизированной фракции липидов 0,1 мл добавляли смесь, состоящий из 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия и 2,5мл смеси хлороформ/метанол (2:1). Затем этой смеси прибавляли 10 мкл внутренних стандартов жирных кислот состоящий из 17:0 (2 µг/мл), 19:0 (0,5 µг/мл) и 23:0 (0,25 µг/мл). Через 5 минут полученную смесь центрифугировали при 16000 об/мин в течение 3 минут. Затем 10 мл нижней слой ЖК отделяют и переносят в пробирки Эппендорф, выпаривали под током азота. К полученному раствору прибавляли 1 мл 0,4 М раствора NaOH в метаноле, тщательно перемешивали в вортексе в течение 10 мин, затем смесь нагревают в течение 30 минут водяной бане при

70С, добавляют 55 мл 32% раствора соляной кислоты и 1,5 мл гексана. Полученной смеси добавляют 3 мл 3 Моль раствора хлористого натрия, отделяют гексановый слой. Раствору добавляют в соотношение 1:3 раствор сульфата натрия и оставляют на сутки, фильтруют и фильтрат вносят в газовый хроматограф. Анализ проводили методом газовой хроматографии, масс-спектрометрии на приборе Agilent 5977B GC/MSD, масс-детектор Agilent 8890 GC. Применялись колонки HP-5MS Ultra inert 30 м × 250 мкм × 0,25 мкм. (каталожный номер Agilent 19091S-433UI). Программа термостат: 40°C в течение 1 минуты, затем 25°C/мин до 220°C, затем 10°C /мин до 240°C. В качестве газа носителя использовали водород (H₂) 1мл / мин, режим инъекции Split (20:1), температура источник 250 ° С, температура в транспортный линии 280 ° С. Задержка для устранения эффектов растворителя-3,5 мин, режим сбора данных SIM. Данные хроматограмм для каждого образца представлялись в числовом виде как значение интенсивности сигнала детектора при соответствующем времени. Статистическая обработка материала проводилась с применением стандартных пакетов программ (Statistica 6 0, Excel 2003). Для определения статистической значимости различий непрерывных величин в зависимости от параметров распределения использовали критерии Стьюдента или критерий Манна-Уитни. Для всех анализов различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Было проведено изучение абсолютного содержания КЖК в ротовой жидкости у практически здоровых пациентов и

пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом.

Результаты изучения абсолютной концентрации КЖК в ротовой жидкости у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом

представлены в табл. 1, из которой видно, что при воспалительных заболеваниях пародонта имеет место понижение абсолютного содержания КЖК по сравнению с практически здоровыми пациентами..

Таблица 1

Содержание КЖК в ротовой жидкости у пациентов хроническим генерализованным пародонтитом

| Монокарбоновые кислоты | Абсолютное содержание, мг/г | |
|------------------------|-----------------------------|------------------|
| | Здоровые лица n= 12 | Больные ХГП n=18 |
| С2 (уксусная) | 0,87 ± 0,062 | 0,26 ± 0,02* |
| С3 (пропионовая) | 0,18 ± 0,015 | 0,07 ± 0,006* |
| С4 (масляная) | 0,05 ± 0,003 | 0,013 ± 0,002* |

Примечание: *- достоверность различий $P < 0,05$

При исследовании относительного содержания отдельных КЖК в ротовой жидкости у пациентов с ХГП выявлены снижение относительного содержания доли уксусной кислоты (С2), доли пропионовой (С3) и доли масляной (С4), что характеризует снижение метаболической активности молочнокислой флоры (бифидо- и лактобактерий). Анализ профилей КЖК с числом углеродных атомов С2-С4, вносящих основной вклад в общий пул кислот в ротовой жидкости у пациентов с ХГП, указывает на снижения в 2,5 раза относительно содержания пропионовой и уксусной кислоты, что говорит об уменьшении активности аэробного звена микроорганизмов — *E. coli*, стрепто- и стафилококков при увеличении активности анаэробного звена, в частности, родов пропионибактерий, бактероидов (в большей степени), родов *Clostridium*, *Fusobacterium* и т. п. (в меньшей степени). Это согласуется с

литературными данными микробиологических исследований, установивших аналогичные изменения в полости рта у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта. При этом, окислительно-восстановительный потенциал ротовой жидкости у пациентов с воспалительными с ХГП средней степени резко смещен в сторону более отрицательных значений, что и способствует активизации факультативных и остаточных анаэробных микроорганизмов. Таким образом, при ХГП отмечено изменение количественного и качественного составов КЖК, что свидетельствует о разноплановых изменениях микробиоценоза. При оценке показателей необходимо отметить, что концентрации КЖК в ротовой жидкости зависят не только от количества продуцируемых микробиотой кислот, но и от других факторов, например активности секреции слюнных желез, что

обуславливает высокую дисперсию. В настоящее время интерпретация представляет определенные сложности из-за малого объема накопленных клинических данных, но с учетом неинвазивности метода и многомерности возможного анализа использование оценки содержания короткоцепочечных жирных кислот в ротовой жидкости имеет важное диагностическое значение в пародонтологии.

Выводы

В ходе исследования ротовой жидкости у больных ХГП с использованием ГХ-МСД выявлено изменение абсолютного содержания короткоцепочечных жирных кислот. Выявлено снижение уровня уксусной кислоты до $0,26 \pm 0,02$ мг/г., пропионовой кислоты до $0,07 \pm 0,006$ мг/г, и масляной кислоты до $0,013 \pm 0,002$ мг/г. в ротовой жидкости пациентов с ХГП средней степени.

Литература / References

- 1 Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2003. 48 с. Режим доступа: <https://search.rsl.ru/ru/record/01004312054>.
2. Буланова, А.В. Хроматография в медицине и биологии: учебное пособие / А.В. Буланова, Ю.Л. Полякова; Федер. агенство по образованию. - 2-е изд. - Самара: Изд-во «Самарский университет», 2006. - 116 с.
3. Затевалов А.М., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Селько-ва Е.П., Миронов А.Ю., Гречишникова О.Г Референсные значения короткоцепочечных жирных кислот в слюне у пациентов ОРИТ без респираторной патологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64(3):153-157
4. Свирина В.В., Богданова В.О., Ардатская М.Д. Динамика микробиоценоза полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта и оценка возможности его коррекции. Медицинский алфавит. 2018;2;8(345):14-20. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=35085914>.
5. Платонова А.Г. Осипов Г.А.Бойко Н.Б. Кириллова Н.В.Родионов Г.Г. Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (12): 46-55. *KlinicheskayaLaboratornayaDiagnostika*. 2015; 60 (12): 46-55. (in Russ.)
6. Osipov G.A., Boiko N.B., Fedosova N.F., Kasikhina S.A., Lyadov K.V. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces. *Microb. Ecol. Health Dis*. 2009; 21: 159-71.
7. Дьяченко И.А, Осипов Г.А., Архипова А., Захарова Л., Мурашев А.Н. Изучение влияния ампициллина на микробиоту кишечника у крыс методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии по маркерным веществам в крови. В кн.: Международное сотрудничество в биотехнологии: Ожидания и реальность. Третья международная конференция из серии "Наука и бизнес" 19-21 июня 2006 г. Тезисы докладов. Пущино; 2006. Available at: http://www.rusbio.biz/ru/nb2006_06.shtm
8. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of plasma saturated fatty acids using

- pentafluorophenyl-di-methylsilyl derivatization / Y.J. Yang [et al.] // *J Chromatogr. B*. 2000. V. 742. P. 37-46.
9. Seppanen-Laakso T., Laakso I., Hiltunen R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition // *Anal. Chim. Acta*. 2002. V. 465. P 39-62.
10. Fast, sensitive and highly discriminant gas chromatography-mass spectrometry method for profiling analysis of fatty acids in serum / N. Sanchez-Avila [et al.] // *J Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 6864-6872.
11. Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography - a comparison of different derivatization and extraction procedures / A.I. Ostermann [et al.] // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2014. V. 91. P. 235-241.
12. Determination of the fatty acid profile of neutral lipids, free fatty acids and phospholipids in human plasma / N. Firl [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013. V. 51. P. 799-810.
13. Орлова, Т.И. Уколов*, А.И. Савельева, Е.С. Радилев А.С. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии смасс-селективным детектированием Аналитика и контроль. 2015. Т 19, № 2. С. 183-188 УДК: 543.433:543.38:543.05 DOI: 10.15826/analitika.2015.19.2.002
14. Galyavich A S Effects of atorvastatm on fatly acids concentration m blood / A. S Galyavich, L R Salakhova // Abstracts from 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, June 10-13, 2007, Helsinki, Finland; *Atherosclerosis Supplements* -2007 - Vol 8, No 1 -P 208
15. Петрович ЮА, Валежин А.И., Филатова ЕС. и др. Изменение содержания короткоцепочечных летучих жирных кислот и их альдегидов в жидкости и воздухе рта при воспалении тканей ротовой полости // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. — 2002. — № 3. — С. 25—26.
16. Летучие жирные кислоты и их диагностическое и прогностическое значение в гастроэнтерологической клинике / М.Д. Ардатская [и др.] // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. - 2000. - №5. - С. 63-70.
17. Способ разделения смеси жирных кислот фракции С2-С6 методом газожидкостной хроматографии: патент (19)RU(11) 2220755(13) С1 / М.Д. Ардатская, Н.С. Иконников, О.Н. Минушкин; заявитель Учебно-научный центр Медицинского Управления делами Президента РФ; заявлено 23.07.2002; опубл. 10.01.2004 // БД Патенты России DVD 2004.
18. Способ количественного определения уксусной, пропионовой, изомасляной, масляной, валериановой, изо-капроновой и капроновой кислот в крови методом газохроматографического анализа: патент (19)RU(11) 2422830(13) С1 / Н.В. Зайцева, Т С. Уланова, Т.В. Нурисламова, Н.А. Попова; заявитель Федеральное государственное учреждение «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления по здоровью населения»; заявлено 23.03.2010; приоритет от 23.03.2010, опубликовано <http://www.findpatent.ru>.
19. Шевелева, М.А. Летучие жирные кислоты в пробиотических средствах и биологически активных

добавках / М.А. Шевелева // Фармация. - 2010, - №3. - С. 13-14.

20. Шевелева, М.А. Определение короткоцепочечных жирных кислот в пищевых продуктах методом

газожидкостной хроматографии / М.А. Шевелева, О.И. Пере- деряев, В.В. Бессонов // Вопросы питания. - 2010. - Т.79. - №5. - С.72-74.